

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 9 - 2 8 9 8 9 6

(43) 公開日 平成 9 年 (1997) 11 月 11 日

(51) Int. Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12P 21/02				
A61K 9/06				
38/00	ABB			
	ABF			
	ABH			

審査請求 未請求 請求項の数 25 F D (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平 8 - 2 6 9 1 0 5	(71) 出願人	0 0 0 1 5 5 9 0 8 株式会社林原生物化学研究所 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号
(22) 出願日	平成 8 年 (1996) 9 月 20 日	(72) 発明者	穂田 研志 岡山県岡山市桑野 5 2 5 番地の 3
(31) 優先権主張番号	特願平 7 - 2 7 0 7 2 5	(72) 発明者	額田 善之 岡山県岡山市奥田 1 丁目 7 番 1 0 - 1 0 6 号
(32) 優先日	平 7 (1995) 9 月 26 日	(72) 発明者	藤井 光清 岡山県岡山市尾上 1 6 3 6 番地
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	谷本 忠雄 岡山県岡山市山崎 3 1 2 番地の 8 8
(31) 優先権主張番号	特願平 8 - 6 7 4 3 4	(72) 発明者	栗本 雅司 岡山県岡山市学南町 2 丁目 7 番 2 5 号
(32) 優先日	平 8 (1996) 2 月 29 日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導する蛋白質

(57) 【要約】

【課題】 免疫担当細胞において I F N - γ の産生を誘導するヒト細胞由来の蛋白質並びにその蛋白質の製造方法及び感受性疾患剤としての用途を提供する。

【解決手段】 N 末端付近に特定のアミノ酸配列を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導するヒト細胞由来の蛋白質と、同蛋白質を産生し得るヒト細胞を増殖させ、増殖細胞から蛋白質を採取してなる蛋白質の製造方法と、有効成分として同蛋白質を含んでなる感受性疾患剤を要旨とする。

09/030061

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N末端付近に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン γ の産生を誘導するヒト細胞由来の蛋白質。

【請求項2】 N末端に配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列を有する請求項1に記載の蛋白質。

【請求項3】 C末端付近に配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を有する請求項1又は2に記載の蛋白質。

【請求項4】 中間部に配列表における配列番号4及び5に示すアミノ酸配列を有する請求項1、2又は3に記載の蛋白質。

【請求項5】 配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列（ただし、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする）を含んでなる請求項1、2、3又は4に記載の蛋白質。

【請求項6】 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量14,000乃至24,000ダルトンを示す請求項1、2、3、4又は5に記載の蛋白質。

【請求項7】 キラー細胞による細胞障害性の増強又はキラー細胞の生成を誘導する性質を有する請求項1、2、3、4、5又は6に記載の蛋白質。

【請求項8】 ヒト造血系細胞に由来する請求項1、2、3、4、5、6又は7に記載の蛋白質。

【請求項9】 請求項1乃至8に記載の蛋白質を産生し得るヒト細胞を増殖させ、増殖細胞から蛋白質を採取してなる蛋白質の製造方法。

【請求項10】 ヒト細胞がヒト造血系細胞株である請求項9に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項11】 ヒト細胞をヒト以外の温血動物に移植し、その温血動物の体液を利用しながら増殖させる請求項9又は10に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項12】 温血動物が齧歯類である請求項11に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項13】 増殖細胞を破碎し、破碎物から蛋白質を採取する請求項9、10、11又は12に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項14】 増殖細胞に誘導剤を作用させる請求項9、10、11、12又は13に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項15】 蛋白質を塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動及び又は等電点電気泳動により採取する請求項9、10、11、12、13又は14に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項16】 有効成分として請求項1乃至8に記載の蛋白質を含んでなる感受性疾患剤。

【請求項17】 インターロイキン2をさらに含んでなる請求項16に記載の感受性疾患剤。

【請求項18】 安定剤として血清アルブミン、ゼラチン、トレハロース及び又はマルトースを含んでなる請求項16又は17に記載の感受性疾患剤。

【請求項19】 抗腫瘍剤としての請求項16、17又は18に記載の感受性疾患剤。

10 【請求項20】 抗腫瘍免疫療法剤としての請求項19に記載の感受性疾患剤。

【請求項21】 抗ウイルス剤としての請求項16、17又は18に記載の感受性疾患剤。

【請求項22】 抗菌剤としての請求項16、17又は18に記載の感受性疾患剤。

【請求項23】 免疫疾患剤としての請求項16、17又は18に記載の感受性疾患剤。

【請求項24】 インターロイキン12をさらに含んでなる請求項23に記載の感受性疾患剤。

20 【請求項25】 アトピー性疾患を治療するための請求項23又は24に記載の感受性疾患剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 この発明は、免疫担当細胞においてインターフェロン γ （以下、「IFN γ 」と略記する。）の産生を誘導するヒト細胞由来の蛋白質に関するものである。

【0002】

30 【従来の技術】 IFN γ は抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有する蛋白質として知られ、抗原やマイトジェンによる刺激を受けた免疫担当細胞が産生すると云われている。これら生物作用故に、IFN γ はその発見当初より抗腫瘍剤としての実用化が窺首され、現在では脳腫瘍を始めとする悪性腫瘍一般の治療剤として積極的に臨床試験が進められている。現在入手し得るIFN γ は免疫担当細胞が産生する天然型IFN γ と、免疫担当細胞から採取したIFN γ をコードするDNAを大腸菌に導入してなる形質転換体が産生する組換え型IFN γ に大別され、上記臨床試験において

40 は、これらのうちのいずれかが「外来IFN γ 」として投与されている。

【0003】 このうち、天然型IFN γ は、通常、培養株化した免疫担当細胞をIFN γ 誘導剤を含む培養培地で培養し、その培養物を精製することにより製造される。この方法では、IFN γ 誘導剤の種類がIFN γ の産生量や精製のし易さ、さらには、製品の安全性等に多大の影響を及ぼすと云われており、通常、コンカナバリンA、レンズ豆レクチン、アメリカヤマゴボウレクチン、エンドトキシン、リボ多糖などのマイトジェン

50 が利用される。しかしながら、これら物質はいずれも分

子中に多様性があり、給源や精製方法によって品質が変動し易く、誘導能の一定したIFN- γ 誘導剤を所望量入手し難いという問題がある。くわえて、上記物質の多くは生体に投与すると顕著な副作用を示したり、物質に依っては毒性を示すものすらあり、生体に直接投与してIFN- γ の産生を誘導するのが極めて困難であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】この発明は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する新規な蛋白質の発見に基づくものである。本発明者らが哺乳類の細胞が産生するサイトカインにつき研究していたところ、コリネバクテリウム死菌体とリポ多糖で予処理したマウスの肝臓中にIFN- γ の産生を誘導する物質が存在することを見出した。カラムクロマトグラフィーを中心とする種々の方法を組合せてこの物質を単離し、その性質・性状を調べたところ、その本質は蛋白質であり、次のような理化学的性質を有していることが半明した。

(1) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量19,000 \pm 5,000ダルトンを示す。

(2) 等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、4.8 \pm 1.0に等電点を示す。

(3) 部分アミノ酸配列

配列表における配列番号8及び9に示す部分アミノ酸配列を有する。

(4) 生物作用

免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する。

【0005】斯かる理化学的性質を有する蛋白質は未だ知られておらず、新規物質であると判断される。そこで、本発明者らが引き続きマウス肝細胞を鋭意検索したところ、この蛋白質をコードするDNAを単離するのに成功した。解読したところ、このDNAは471塩基対からなり、配列表における配列番号10に示すアミノ酸配列をコードしていることが半明した(ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、メチオニン又はトレオニンを表わすものとする)。

【0006】これら知見に基づき、ヒト肝細胞を引き続き検索したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するさらに別の新規物質をコードするDNAが得られた。この物質の本質はポリペプチドであり、DNAを解読したところ、配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列を含んでなることが半明した(ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする)。その後、このDNAを大腸菌に導入し、発現させたところ、培養物中にポリペプチドが好収量で産生した。以上の知見は、同じ特許出願人による特開平8-27189号公報及び特開平8-193098号公報に開示されている。また、同

じ特許出願人による特開平7-78357号明細書には、斯かるポリペプチドの感受性疾患剤としての用途が開示されている。ところが、一般に、医薬品に配合してヒトに投与する生理活性蛋白質はヒト細胞由来のものが望ましいところ、斯かるポリペプチドを産生し得るヒト細胞は未だ見出されていない。

【0007】斯かる状況に鑑み、この発明の課題は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するヒト細胞由来の蛋白質を提供することにある。

【0008】この発明の別の課題は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するヒト細胞由来の蛋白質の製造方法を提供することにある。

【0009】この発明のさらに別の課題は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するヒト細胞由来の蛋白質の感受性疾患剤としての用途を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記第一の課題を、N末端付近に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導するヒト細胞由来の蛋白質により解決するものである。

【0011】この発明は、前記第二の課題を、斯かる蛋白質を産生し得るヒト細胞を増殖させ、増殖細胞から蛋白質を採取してなる蛋白質の製造方法により解決するものである。

【0012】この発明は、前記第三の課題を、有効成分として斯かる蛋白質を含んでなる感受性疾患剤により解決するものである。

【0013】

【作用】この発明の蛋白質は、免疫担当細胞に単独又は適宜補因子とともに作用させると、IFN- γ の産生を誘導する。

【0014】ヒト細胞由来の斯かる蛋白質は、ヒト細胞を用いるこの発明の製造方法により、所望量を比較的容易に製造することができる。

【0015】この発明の感受性疾患剤は、ヒトに投与すると、ヒト体内の免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導し、IFN- γ 感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。当該蛋白質がキラー細胞による細胞障害性の増強又はキラー細胞の生成を誘導する性質を兼備するときには、悪性腫瘍を始めとする難治性疾患の治療に効果を発揮する。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、この発明の実施の形態につき説明するに、この発明でいう蛋白質とは、N末端付近に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するポリペプチド及び糖蛋白質全般を意味する。ヒト細胞の種類や増殖条件にも依るが、この発明の蛋白質はN末端

及びC末端付近にそれぞれ配列表における配列番号1及び3に示すアミノ酸配列を有し、中間部に配列表における配列番号4乃至5に示すアミノ酸配列を介して、全体として配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列を含んでなることがある(ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする)。そして、還元剤存在下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定すると、分子量14,000乃至24,000ダルトン、通常、18,000乃至19,500ダルトンに相当する位置に蛋白質のバンドを示す。ヒト細胞の種類や増殖条件に依

【0017】斯かる蛋白質は、ヒト細胞を用いるこの発明の製造方法により製造することができる。ヒト細胞としては、通常、リンパ芽球、リンパ球、単芽球、単球、骨髓芽球、骨髓球、顆粒球、マクロファージなどのヒト造血系細胞や、例えば、肺癌、大腸癌、結腸癌、類表皮癌などの固形腫瘍由来の細胞株が用いられ、個々の細胞株としては、例えば、顎下腺類表皮癌由来の上皮様細胞株であるA-253細胞(ATCC HTB41)や、ジュン・ミノワダ『キャンサー・レビュー』、第10巻、1乃至18頁(1988年)などに記載されている骨髓性白血病、前骨髓性白血病、単球性白血病、成人T細胞白血病及びヘアリー細胞白血病を含む白血病又はリンパ腫由来のHBL-38細胞、HL-60細胞(ATCC CCL240)、K-562細胞(ATCC CCL243)、KG-1細胞(ATCC CCL246)、Mo細胞(ATCC CRL8066)、THP-1細胞(ATCC TIB202)、U-937細胞(ATCC CRL1593)などの白血病細胞株及びそれらの変異株が挙げられる。これら細胞株はいずれも増殖容易であり、しかも、当該蛋白質の産生能力が高いので、この発明の製造方法を有利に適用できる。殊に、A-253細胞を始めとする上皮様細胞株や、HBL-38細胞、HL-60細胞、KG-1細胞、THP-1細胞及びU-937細胞を始めとするヒト骨髓単球系細胞株は当該蛋白質の産生能力が著しく高く、この発明の製造方法を実施するうえで極めて有用である。

【0018】この発明の製造方法においては、斯かるヒト細胞を増殖させ、得られる増殖細胞から目的とする蛋白質を採取する。ヒト細胞を増殖させる方法に特に制限はなく、通常一般の生体外又は生体内の方法を適用す

ばよい。生体外の方法とは培養培地を用いて増殖させる方法をいい、ヒト細胞を、例えば、ウシ胎児血清を0.3乃至30%(w/v)程度補足したRPMI1640培地、MEM培地、DME培地などの動物細胞を増殖させるための斯界における慣用の培養培地に細胞密度約 1×10^4 乃至 1×10^5 個/ml、望ましくは、約 1×10^4 乃至 1×10^5 個/mlになるように浮遊させ、培養培地を適宜新鮮なものと取換えつつ、pH7乃至8、望ましくは、pH7.2乃至7.4、温度36乃至38°C、望ましくは、37°C前後で約1日乃至1週間培養する。そして、培養物から増殖細胞を分離し、目的とする蛋白質を採取する。なお、ヒト細胞の種類や培養条件に依っては、培養中、産生した当該蛋白質が細胞外に放出されることがある。すなわち、ヒト細胞において当該蛋白質の産生を誘導し得る、例えば、マイトジェンやIFN- γ などの誘導剤を培養培地に共存させるときには、産生した当該蛋白質の一部又は全部が細胞外に分泌されることがあり、この場合には、培養上清からも当該蛋白質を採取できる。

【0019】一方、ヒト以外の温血動物を利用する生体内の方法により増殖させるには、通常、マウス、ヌードマウス、ラット、ヌードラット、モルモット、ハムスターなどの齧歯類の新生児にウサギ由来の抗胸腺抗体などを注射して免疫反応を減弱させた後、ヒト細胞を動物1匹当たり約 1×10^4 乃至 1×10^5 個皮下又は腹腔内に注射移植するか、あるいは、これら温血動物の成長個体の体外又は体内に設けられ、動物の栄養体液が循環可能な拡散チャンパーなどの容器内にヒト細胞を收容し、その後、通常一般の方法により動物を約2乃至10週間飼育する。この飼育の間、移植したヒト細胞は温血動物の体液を利用しながら増殖する。増殖細胞は細胞塊、腹水又は細胞浮遊液として採取され、必要に応じて、これを適宜分散液中で分散・洗浄した後、目的とする蛋白質を採取する。生体内の増殖方法は、生体外の増殖方法と比較して、より少ないコストと労力で短時間に所望量の増殖細胞の得られる利点がある。なお、生体内の増殖方法は、例えば、特公昭56-54158号公報などにも詳述されている。

【0020】増殖細胞から当該蛋白質を採取するには、増殖細胞を一旦分離するか培養上清とともに超音波を印加するか、ホモゲナイズ、凍結融解、あるいは、低張媒体中に浸漬するなどして破碎し、得られる破碎物又は破碎物と培養上清との混合物から当該蛋白質を採取すればよい。斯かる破碎物又は混合物から当該蛋白質を採取するには、必要に応じて、37°C前後で1乃至24時間インキュベートした後、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動及び/又は

10

20

30

40

50

等電点電気泳動などの生理活性蛋白質を精製するための斯界における慣用の方法を適用すればよく、これらは適宜組合せて適用される。そして、最終使用形態に応じて、採取した蛋白質を濃縮・凍結乾燥して液状又は固状とする。なお、同じ特許出願人による特願平7-58240号明細書に開示されたモノクローナル抗体は当該蛋白質の精製に極めて有用であり、このモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーによるときには、高純度の当該蛋白質を最少のコストと労力で得ることができる。

【0021】前述のとおり、この発明の蛋白質は免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質を有する。この性質により、この発明の蛋白質は細胞培養法によりIFN- γ を製造する際の誘導剤として、さらには、IFN- γ に感受性を有する、例えば、後天性免疫不全症候群(AIDS)や尖圭コンジロムなどのウイルス性疾患、悪性腎腫瘍、肉芽腫、菌状息肉症、脳腫瘍などの悪性腫瘍、関節リウマチやアレルギー症などの免疫疾患に対する治療剤・予防剤として有用である。

【0022】この発明の蛋白質は、通常、免疫担当細胞を培養してIFN- γ を製造するための培養培地に共存させるか、IFN- γ 感受性疾患の治療・予防のためにヒトに投与される。すなわち、前者の用途においては、哺乳類の末梢血から分離される白血球や、例えば、HB L-38細胞、Mo細胞(ATCC CRL 8066)、Jurkat細胞(ATCC CRL 8163)、HuT78細胞(ATCC TIB 161)、EL4細胞(ATCC TIB 39)、L12-R4細胞などの培養株化した免疫担当細胞又はその変異株をこの発明の蛋白質を1ml当たり約0.1ng乃至1 μ g、望ましくは、約1乃至100ng含む適宜の培養培地に浮遊させる。必要に応じて、培養培地にマイトジェンやインターロイキン2、抗CD3抗体などのT細胞刺激物質を加え、培養培地を適宜新鮮なものと取換えながら、通常一般の方法により約1乃至100時間培養する。斯くして得られる培養液にIFN- γ を精製するための慣用の方法、すなわち、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの1種又は2種以上を適宜組合せて適用することにより、IFN- γ を採取することができる。

【0023】さらに、この発明の蛋白質はヒトの免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導することから、有効成分として当該蛋白質を含んでなる感受性疾患剤は、ヒトに投与すると、体内の免疫担当細胞がIFN- γ を産生するのを促し、IFN- γ 感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。また、後記実験例及び実施例に例示する蛋白質のように、蛋白質が免疫担当細胞におい

てIFN- γ の産生を誘導する性質に加えて、NK細胞やLAK細胞(リンホカイン活性化キラー細胞)、細胞障害性T細胞などのキラー細胞による細胞障害性の増強又はキラー細胞の生成を誘導する性質を兼備するときには、キラー細胞も感受性疾患の治療・予防に関与することとなる。したがって、この発明でいう感受性疾患とは、IFN- γ 感受性疾患を含む、IFN- γ 及び/又はキラー細胞が直接又は間接に関与して治療及び/又は予防し得る疾患一般を意味するものとし、具体的には、例えば、肝炎、ヘルペス症、尖圭コンジロム、AIDSなどのウイルス性疾患、カンジダ症、マラリヤ症、クリプトコックス症、エルシニア症などの感染症、悪性腎腫瘍、菌状息肉症、慢性肉芽腫などの固形悪性腫瘍、成人T細胞白血病、慢性骨髄性白血病、悪性リンパ腫などの血球系悪性腫瘍、さらには、アレルギー症、リウマチなどの免疫疾患を挙げることができる。また、インターロイキン3と併用するときには、白血病、骨髄腫、さらには、悪性腫瘍を治療する際の放射線照射や化学療法剤の投与に伴う白血球減少症や血小板減少症の完治又は緩解にも効果を発揮する。

【0024】斯くして、この発明の感受性疾患剤は、上記のごとき感受性疾患を治療・予防するための抗腫瘍剤、抗ウイルス剤、抗菌剤、免疫疾患剤、血小板増多剤、白血球増多剤などとして多種多様な用途を有することとなる。剤型並びに感受性疾患の種類及び病状にも依るか、この発明の感受性疾患剤は、通常、液状、ペースト状又は固形状に調製され、当該蛋白質を0.00001乃至100% (w/w)、望ましくは、0.0001乃至0.1% (w/w) 含んでなる。

【0025】この発明の感受性疾患剤は当該蛋白質単独の形態はもとより、当該蛋白質とそれ以外の生理的に許容される、例えば、担体、賦形剤、希釈剤、免疫助成剤、安定剤、さらには、必要に応じて、他の生理活性物質の1種又は2種以上との組成物としての形態をも包含する。安定剤としては、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、トレハロース及びマルトースなどが、また、併用し得る他の生理活性物質としては、例えば、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン12、TNF- α 、TNF- β 、カルホロン、シクロホスファミド、アクリラルビン、チオテパ、ブスルファン、アンシタビン、シタラビン、フルオロウラシル、テトラヒドロフリルフルオロウラシル、メトトレキセート、アクチノマイシンD、クロモマイシンA₁、ダウノルビン、ドキソルビン、プレオマイシン、マイトマイシンC、ビンクリスチン、ビンブラスチン、L-アスパラギナーゼ、金コロイド、クレスチン、ビシバニール、レンチナ₁及び丸山ワクチンなどが挙げられる。このうち、インターロイキン2との併用は、インターロイキン2がこの発明の蛋白質が免疫担当細胞においてIFN- γ の産生

を誘導する際の補因子として機能するので特に有利である。天然型又は組換え型ヒトインターロイキン2を併用することにより、当該蛋白質単独ではIFN- γ を産生し難い免疫担当細胞においても所期のIFN- γ 産生を誘導することができる。また、インターロイキン12と併用するときには、当該蛋白質又はインターロイキン12単独では容易に達成し得ない、極めて高レベルのIFN- γ 産生を誘導することができる。しかも、当該蛋白質は、ヒト体内におけるインターロイキン12によるイムノグロブリンE抗体の産生阻害を高めるので、イムノグロブリンE抗体の産生を主因とする、例えば、アトピー性喘息、アトピー性気管支喘息、枯草熱、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、血管性浮腫、アトピー性消化器異常を始めとするアトピー性疾患を治療するための免疫疾患剤においても極めて有用である。なお、ヒトの体内には、微量ではあるが、インターロイキン12が存在することがあるので、斯かる場合には、当該蛋白質のみを投与すれば所期の治療効果が達成できる。

【0026】さらに、この発明の感受性疾患剤は、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、当該蛋白質を、例えば、1回当たりの用量又はその整数倍(4倍まで)若しくはその約数(1/40まで)に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、注射剤、液剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、舌下剤、点眼剤、点鼻剤、坐剤などが挙げられる。

【0027】この発明の感受性疾患剤は経口的に投与しても非経口的に投与しても、また、以下に述べるように抗腫瘍細胞などを体外で活性化させる場合に用いてもよく、いずれの場合にも、感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。感受性疾患の種類や症状にも依るが、具体的には、患者の症状や投与後の経過を観察しながら、成人当たり約0.1 μ g乃至50mg/回、望ましくは、約1 μ g乃至1mg/回の蛋白質を1乃至4回/日又は1乃至5回/週の用量で1日乃至1年間に亘って経口投与するか、皮内、皮下、筋肉内又は静脈内に非経口投与すればよい。

【0028】この発明の感受性疾患剤は、インターロイキン2を用いる、いわゆる「抗腫瘍免疫療法」にも有用である。抗腫瘍免疫療法は、一般に、(i)悪性腫瘍患者の体内に直接インターロイキン2を投与する方法と、(ii)インターロイキン2により生体外で活性化させた抗腫瘍細胞を患者の体内に移入する方法(養子免疫療法)に大別されるが、当該蛋白質を併用するときには、その効果を有意に高めることができる。具体的には、前記(i)の方法の場合、患者にインターロイキン2を投与すると同時に又は事前に当該蛋白質を成人当たり約0.1 μ g乃至1mg/回の用量で1乃至10回投与する。インターロイキン2の投与量は、悪性腫瘍の種類、

患者の症状及び蛋白質の用量にも依るが、通常、成人当たり約10,000乃至1,000,000単位/回とする。一方、前記(ii)の方法の場合には、悪性腫瘍患者から採取した単核球又はリンパ球をインターロイキン2の存在下で培養するに当たり、それら血球1 \times 10⁶個当たり当該蛋白質を約0.1ng乃至1 μ g共存させておく。そして、一定時間培養後、培養物からNK細胞又はLAK細胞を採取し、これを元の患者に移入するのである。この発明による抗腫瘍免疫療法の対象となり得る疾患としては、例えば、結腸癌、直腸癌、大腸癌、胃癌、甲状腺癌、舌癌、膀胱癌、絨毛癌、肝癌、前立腺癌、子宮癌、喉頭癌、肺癌、乳癌、悪性黒色腫、カポジ肉腫、脳腫瘍、神経芽細胞腫、卵巣腫瘍、睾丸腫瘍、骨肉腫、膀胱癌、悪性腎腫瘍、副腎腫、血管内皮腫などの固形悪性腫瘍や白血病、悪性リンパ腫などの血球系悪性腫瘍が挙げられる。

【0029】次に、この発明の蛋白質につき、実験例を挙げて説明する。

【0030】

【実験例1】

<蛋白質の調製>常法により、生後間もないハムスターの新生児にウサギ由来の抗胸腺抗血清を注射して免疫反応を減弱させた後、ハムスターの背部皮下にヒト急性単球性白血病由来の骨髓単球系細胞株の一種であるTHP-1細胞(ATCC TIB202)を約5 \times 10⁵個/匹注射移植し、通常一般の方法で3週間飼育した。そして、皮下に生じた腫瘍塊(約15g/匹)を摘出し、常法により生理食塩水中で分散させた後、緩衝液(以下、「PBS」と云う。)で洗浄した。

【0031】得られた増殖細胞をマシュー・ジェー・コスラ『プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エー』、第86巻、5,227乃至5,231頁(1989年)に記載された方法に準じて10mM塩化ナトリウム、1.5mM塩化マグネシウム、0.1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩を含む10倍容の氷冷20mMヘプス緩衝液(pH7.4)で洗浄し、3倍容の新鮮な同一緩衝液中、氷冷下で20分間静置し、-80℃で凍結後、解凍して細胞を破碎した。破碎物を遠心分離し、上清を予め10mMヘプス緩衝液(pH6.6)で平衡化させておいたファルマシア製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『DEAE-セファロース』のカラムに負荷し、カラムを10mMヘプス緩衝液(pH6.6)で洗浄後、塩化ナトリウム濃度が0Mから0.5Mまで段階的に上昇する10mMヘプス緩衝液(pH6.6)を通液し、塩化ナトリウム濃度が0.2M付近で溶出した画分を採取した。

【0032】この画分を10mMヘプス緩衝液(pH6.8)に対して透析後、予め10mMヘプス緩衝液(pH6.8)で平衡化させておいたトソー製イオン交換ク

ロマトグラフィー用ゲル『DEAE 5PW』のカラムに負荷し、0Mから0.5Mに直線的に上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mM磷酸緩衝液(pH6.8)を通液し、塩化ナトリウム濃度が0.2乃至0.3M付近で溶出した画分を採取した。

【0033】この新たに得られた画分を合一し、PBSに対して透析する一方、同じ特許出願人による特願平7-58240号明細書に記載された方法にしたがってモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲルを調製し、プラスチック製円筒管内部にカラム状に充填し、PBSで洗浄後、上記透析内液をカラムに負荷した。カラムに100mMグリシン-塩酸緩衝液(pH2.5)を通液し、得られる溶出画分から免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質を含む画分を採取し、滅菌蒸留水に対して透析し、膜濾過により濃縮後、凍結乾燥して精製蛋白質の固状物を得た。収量は、ハムスター1匹当たり約50ngであった。

【0034】

【実験例2】

<分子量>実験例1の方法により得た精製蛋白質をユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、680乃至685頁(1970年)に報告している方法に準じ、還元剤としての2%(w/v)ジチオトレイトール存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量18,000乃至19,500ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある蛋白質の主バンドが観察された。なお、このときの分子量マーカーは、ウシ血清アルブミン(67,000ダルトン)、オボアルブミン(45,000ダルトン)、カーボニックアンヒドラーゼ(30,000ダルトン)、大豆トリプシンインヒビター(20,100ダルトン)及び α -ラクトアルブミン(14,400ダルトン)であった。

【0035】

【実験例3】

<N末端付近のアミノ酸配列及びペプチド・マッピング>

【0036】

【実験例3-1】

<N末端付近のアミノ酸配列>パーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサ『473A型』を使用し、常法にしたがって分析したところ、実験例1の方法により得た精製蛋白質はN末端付近に配列表における配列番号1、詳細には、配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0037】

【実験例3-2】

<ペプチド・マッピング>実験例1の方法により得た精製蛋白質を適量の滅菌蒸留水に溶解し、溶液を予め0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸水溶液により平衡化さ

せておいた昭和電工製高速液体クロマトグラフィー用ゲル『アサヒバックC4P-50 4E』のカラムに負荷し、カラムを0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸水溶液により洗浄した後、0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸を含み、アセトニトリルの濃度が0%(v/v)から90%(v/v)に直線的に上昇するトリフルオロ酢酸/アセトニトリル/水混液を60ml/時間の流速で通液した。溶出画分から免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質を含む画分を採取し、1Mトリス水溶液(pH11.2)により中和し、常法にしたがって濃縮し、アセトニトリルを除去する一方、別途、50mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)にシグマ製クロストリパイン剤を適量溶解し、この溶液に濃縮蛋白質を対クロストリパインのモル比で約50倍加え、pHを8乃至9に保ちつつ、37℃で12時間反応させて蛋白質のペプチド断片を含む反応物を得た。

【0038】この反応物を予め0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸水溶液により平衡化させておいたトーソー製高速液体クロマトグラフィー用ゲル『ODS-120T』のカラムに負荷し、カラムを0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸水溶液により洗浄した後、溶出画分中のペプチド濃度を波長214nmにおける吸光度によりモニタしながら、0.09%(v/v)トリフルオロ酢酸を含み、アセトニトリルの濃度が0%(v/v)から70%(v/v)まで直線的に上昇するトリフルオロ酢酸/アセトニトリル/水混液を30ml/時間の流速で通液した。このとき得られたペプチド・マップを図1に示す。

【0039】図1のペプチド・マップにおいて、溶出開始から約59分、約62分及び約68分後に溶出したペプチド断片(以下、それぞれ「ペプチド断片1」、「ペプチド断片2」及び「ペプチド断片3」と云う。)をそれぞれ別々に採取し、そのアミノ酸配列をパーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサ『473A型』を使用し、常法にしたがって分析した。その結果、ペプチド断片1及び2は、それぞれ、配列表における配列番号3及び7に示すアミノ酸配列を、また、ペプチド断片3は配列表における配列番号4及び5に示すアミノ酸配列を有することが判明した。これらアミノ酸配列と配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列を比較したところ、ペプチド断片1乃至3のアミノ酸配列は、その配列番号6に示すアミノ酸配列におけるそれぞれ第148乃至157番目、第1乃至13番目及び第45乃至58番目若しくは第80乃至96番目に相当することが判明した。したがって、ペプチド断片1及び2は分析に供した蛋白質におけるそれぞれC末端及びN末端フラグメントに、また、ペプチド断片3はその蛋白質における中間部フラグメントに相当すると判断された。

【0040】これらの結果と精製蛋白質がSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において分子量約18,0

0.0乃至1.9, 500ダルトンに相当する位置に蛋白質の主バンドを示すという実験例2の知見、さらには、配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列から計算される分子量が18, 199ダルトンであることを総合的に判断すると、実験例1の方法により得た精製蛋白質は配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列を含んでなると結論される。

【0041】

【実験例4】

<生物作用>

【0042】

【実験例4-1】

<免疫担当細胞におけるIFN- γ の産生>ヘパリン加注射器により健常者から血液を採取し、血清無含有のRPMI 1640培地(pH7.4)により2倍希釈した。血液をファルマシア製フィコール上に重層し、遠心分離して採取したリンパ球を10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH7.4)により洗浄した後、新鮮な同一培地に細胞密度 5×10^4 個/mlになるように浮遊させ、96ウェルマイクロ

プレートに0.15ml/ウェルずつ分注した。

【0043】別途、実験例1の方法により得た精製蛋白質を10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH7.4)により適宜濃度に希釈して上記マイクロプレートに0.05ml/ウェルずつ分注し、2.5 μ g/mlコンカナバリンA又は50単位/ml組換え型ヒトインターロイキン2を含むか含まない新鮮な同一培地を0.05ml/ウェル加えた後、5% CO₂ インキュベータ中、37℃で24時間培養した。10 培養後、各ウェルから培養上清を0.1mlずつ採取し、通常の酵素免疫測定法によりIFN- γ を測定した。同時に、精製蛋白質のみを省略した系を設け、上記と同様に処置して対照とした。結果を表1に示す。なお、表1中のIFN- γ 含量は、米国国立衛生研究所(NIH)から入手したIFN- γ 標品(Gg23-901-530)に基づき国際単位(IU)に換算している。

【0044】

【表1】

蛋白質濃度 (ng/ml)	IFN- γ 産生量 (IU/ml)		
	蛋白質	蛋白質 + コンカナバリンA	蛋白質 + インターロイキン2
0	<0.5	<2	<0.5
0.32	<0.5	6 \pm 2	2 \pm 1
1.8	10 \pm 2	70 \pm 20	60 \pm 20
8	140 \pm 10	490 \pm 80	570 \pm 30
40	180 \pm 20	620 \pm 10	880 \pm 50
200	280 \pm 20	800 \pm 20	1500 \pm 400

【0045】表1の結果は、当該蛋白質を作用させると、免疫担当細胞としてのリンパ球がIFN- γ を産生したことを示している。また、表1の結果に見られるように、このIFN- γ 産生は、補因子としてインターロイキン2又はコンカナバリンAを共存させると、一段と高まる。

【0046】

【実験例4-2】

<NK細胞による細胞障害性の増強>ヘパリン加注射器により健常者から血液を採取し、PBSにより2倍希釈した。血液をフィコール上に重層し、遠心分離して高密度リンパ球を得た。

【0047】このリンパ球を細胞密度 1×10^4 個/mlになるように10 μ g/mlカナマイシン、5 \times 10⁻⁴M 2-メルカプトエタノール及び10% (v/v) ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地(pH7.2)に浮遊させ、12ウェルマイクロプレートに0.5ml/ウェルずつ分注した。そして、実験例1の方法により得た精製蛋白質を新鮮な同一培地に適宜希釈してマ

イクロプレートに1.5ml/ウェルずつ加え、さらに、50単位/ml組換え型ヒトインターロイキン2を含むか含まない新鮮な同一培地を0.5ml/ウェル加えた後、5% CO₂ インキュベータ中、37℃で24時間培養し、PBSで洗浄して効果細胞としてのNK細胞を含む培養リンパ球を得た。

【0048】別途、常法により⁵¹Cr 標識したNK細胞感受性標的細胞としてのヒト慢性骨髄性白血病由来のK-562細胞(ATCC CCL243)を96ウェルマイクロプレートに 1×10^4 個/ウェルずつとり、上記で調製した効果細胞を効果細胞/標的細胞比で2, 5:1, 5:1又は10:1の割合で加え、5% CO₂ インキュベータ中、37℃で4時間培養した後、常法にしたがって培養上清の放射能を測定して死滅標的細胞数を求めた。そして、各々の系につき、試験に供した標的細胞数に対する死滅標的細胞数の百分率(%)を計算し、細胞障害性の目安とした。結果を表2に示す。

【0049】

【表2】

蛋白質濃度 (pM)	インターロイキン2濃度 (単位/ml)	細胞障害性 (%)		
		効果細胞/標的細胞		
		2.5/1	5/1	10/1
0	0	19	36	59
0	10	28	44	61
0.5	0	22	41	63
0.5	10	31	54	69
5	0	28	49	66
5	10	36	58	71
50	0	29	53	67
50	10	42	62	72
500	0	33	56	84
500	10	57	78	96

註：表中、「pM」は 10^{-12} Mを意味する。

【0050】表2の結果は、当該蛋白質にNK細胞による細胞障害性を増強する性質のあることを示している。また、表2の結果に見られるように、この細胞障害性の増強は、インターロイキン2が共存すると、一段と増強 20 される。

【0051】

【実験例4-3】

＜LAK細胞の生成誘導＞常法により ^{51}Cr 標識したNK細胞非感受性標的細胞としてのヒトパーキットリンパ腫由来のRaji細胞(ATCC CCL86)を96

ウェルマイクロプレートに 1×10^4 個/ウェルずつとり、72時間培養した以外は実験例4-2と同様にして調製した効果細胞としてのLAK細胞を含む培養リンパ球を効果細胞/標的細胞比で5:1、10:1又は20:1の割合で加え、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで4時間培養した後、常法にしたがって培養上清の放射能を測定した。その後、実験例4-2と同様にして細胞障害性(%)を計算した。結果を表3に示す。

【0052】

【表3】

蛋白質濃度 (pM)	インターロイキン2濃度 (単位/ml)	細胞障害性 (%)		
		効果細胞/標的細胞		
		5/1	10/1	20/1
0	0	12	23	31
0	10	14	25	35
0.5	0	14	24	34
0.5	10	18	32	42
5	0	16	26	37
5	10	21	36	50
50	0	22	41	49
50	10	26	52	56
500	0	27	44	61
500	10	33	59	72

註：表中、「pM」は 10^{-12} Mを意味する。

【0053】表3の結果は、当該蛋白質にLAK細胞の生成を誘導する性質のあることを示している。また、表3の結果に見られるように、この誘導は、インターロイキン2が共存すると、一段と増強される。

【0054】

【実験例5】

＜急性毒性試験＞常法にしたがって、8週齢のマウスに 50

実験例1の方法により得た精製蛋白質を経皮、経口又は腹腔内に注射投与した。その結果、精製蛋白質のLD50は、いずれの投与経路によっても約1mg/kg以上であった。このことは、当該蛋白質がヒトに投与する医薬品に配合して安全であることを裏付けている。

【0055】周知のように、IFN- γ はウイルス、細菌などに対する感染防御、悪性腫瘍の増殖抑制、免疫機

能の調節作用を通じてヒトの生体防御、さらには、イムノグロブリンE抗体の産生阻害に多大の関与をしている。前述のとおり、IFN- γ はヒトの感受性疾患剤としてすでに実用化されており、その対象疾患、用量、用法及び安全性はほぼ確立している。一方、フランセス・アール・パークウィル著、渡部好彦訳、『サイトカインとがん治療』、1991年、東京化学同人発行などにも記載されているように、NK細胞及びLAK細胞などのキラー細胞を利用する療法は、抗腫瘍免疫療法を始めとして、多種多様のヒト疾患に対して試みられ、総じて良好な成果が報告されている。最近では、サイトカインを用いるキラー細胞による細胞障害性の増強又はキラー細胞の生成の誘導と治療効果との関連性が注目されており、例えば、ティー・フジオカら『ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ユーロロジー』、第73巻、第1号、23乃至31頁(1994年)には、LAK細胞とインターロイキン2を併用する抗腫瘍免疫療法において、インターロイキン2がLAK細胞の生成を顕著に誘導し、重篤な毒性や副作用を惹起することなく、ヒトの転移癌に格別の効果を発揮したと報告されている。

【0056】このように、多種多様のヒト疾患の治療・予防にIFN- γ やキラー細胞が深く係わり、その完治又は緩解への多大の寄与が明らかになっている。斯かる状況において、実施例4乃至5の結果に見られるように、当該蛋白質が顕著な毒性を示すことなく、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するとともに、NK細胞による細胞障害性の増強又はLAK細胞の生成を誘導したことは、この発明の感受性疾患剤が重篤な副作用を惹起することなくヒトに長期間連用でき、IFN- γ 及び/又はキラー細胞が関与する疾患の治療・予防に効果を発揮することを示している。

【0057】以下、この発明の実施の形態につき、実施例を挙げて具体的に説明する。なお、実施例A-1乃至A-8にはこの発明による蛋白質の製造方法の実施形態が、また、実施例B-1乃至B-6にはこの発明の感受性疾患剤の実施形態が例示されている。

【0058】

【実施例A-1】

<蛋白質の製造>常法により、生後間もないハムスターの新生児にウサギ由来の抗胸腺抗血清を注射して免疫反応を減弱させた後、ハムスターの背部皮下にヒト急性単球性白血病由来の骨髓単球系細胞株の一種であるTHP-1細胞(ATCC TIB202)を約 5×10^4 個/匹注射移植し、通常一般の方法で3週間飼育した。そして、皮下に生じた腫瘍塊(約15g/匹)を摘出し、常法により生理食塩水中で分散させた後、PBSで洗浄した。

【0059】得られた増殖細胞をマシュー・ジェー・コスラら『プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エー』、

第86巻、5、227乃至5、231頁(1989年)に記載された方法に準じて10mM塩化カリウム、1、5mM塩化マグネシウム、0、1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩を含む10倍容の氷冷20mMヘプス緩衝液(pH7、4)で洗浄し、3倍容の新鮮な同一緩衝液中、氷冷下で20分間静置し、-80℃で凍結後、解凍して細胞を破碎した。破碎物を遠心分離し、上清を予め10mM磷酸緩衝液(pH6、6)で平衡化させておいたファルマシア製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『DEAE-セファロース』のカラムに負荷し、カラムを10mM磷酸緩衝液(pH6、6)で洗浄後、塩化ナトリウム濃度が0Mから0、5Mまで段階的に上昇する10mM磷酸緩衝液(pH6、6)を通液し、塩化ナトリウム濃度が0、2M付近で溶出した画分を採取した。

【0060】この画分を10mM磷酸緩衝液(pH6、8)に対して透析後、予め10mM磷酸緩衝液(pH6、8)で平衡化させておいたトソー製イオン交換クロマトグラフィー用ゲル『DEAE 5PW』のカラムに負荷し、0Mから0、5Mに直線的に上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10mM磷酸緩衝液(pH6、8)を通液し、塩化ナトリウム濃度が0、2乃至0、3M付近で溶出した画分を採取した。

【0061】この新たに得られた画分を合一し、PBSに対して透析する一方、同じ特許出願人による特開平7-58240号明細書に記載された方法にしたがってモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲルを調製し、プラスチック製円筒筒内部にカラム状に充填し、PBSで洗浄後、上記透析内液をカラムに負荷した。カラムに100mMグリシン塩酸緩衝液(pH2、5)を通液し、得られる溶出画分から免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質を含む画分を採取し、減圧蒸留水に対して透析し、膜透過により濃縮後、凍結乾燥して精製蛋白質の固体物を得た。収量は、ハムスター1匹当たり約50ngであった。

【0062】

【実施例A-2】

<蛋白質の製造>生後間もないヌードマウス新生児の背部皮下にヒト急性骨髓性白血病由来の骨髓単球系細胞株の一種であるKG-1細胞(ATCC CCL246)を約 1×10^4 個/匹注射移植し、通常一般の方法で4週間飼育した。皮下に生じた腫瘍塊(約20g/匹)を摘出し、常法により生理食塩水中で分散させ、得られた増殖細胞を洗浄し、実施例A-1と同様にして破碎し、破碎物を精製したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する精製蛋白質がヌードマウス1匹当たり約20ng得られた。

【0063】その後、精製蛋白質の一部をとり、実施例2乃至4の方法に準じて分析したところ、精製蛋白質は

N末端付近に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、実験例1の蛋白質と同様の分子量、生物作用を示した。

【0064】

【実施例A-3】

＜蛋白質の製造＞孔径0.5ミクロンのメンブランフィルターを取付けた内容量約10mlのプラスチック製円筒型拡散チェンバー内にRPMI1640培地(pH7.4)でヒト急性前骨髄性白血病由来の骨髄単球系細胞株の一種であるHL-60細胞(ATCC CCL2 10 40)を浮遊させ、成長ラットの腹腔内に埋設した。この状態でラットを通常一般の方法で4週間飼育した後、拡散チェンバーを取出した。拡散チェンバーから増殖細胞を採取し、生理食塩水で洗浄後、実施例A-1と同様にして破碎し、破碎物を精製したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する精製蛋白質がラット1匹当たり約20ngの収量で得られた。

【0065】その後、精製蛋白質の一部をとり、実験例2乃至4の方法に準じて分析したところ、精製蛋白質はN末端付近に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、実験例1の蛋白質と同様の分子量、生物作用を示した。

【0066】

【実施例A-4】

＜蛋白質の製造＞ヒト急性単球性白血病由来の骨髄単球系細胞株の一種であるTHP-1細胞(ATCC TIB202)を10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に細胞密度約 3×10^5 個/mlになるように浮遊させ、培養培地を新鮮なものとの交換えながら、10%CO₂、インキュベーター中、37℃で3週間培養した。培養物から増殖細胞を分離し、生理食塩水で洗浄後、実施例A-1と同様にして破碎し、破碎物を精製したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する精製蛋白質が培養物11 30 当たり約10ngの収量で得られた。

【0067】その後、精製蛋白質の一部をとり、実験例2乃至4の方法に準じて分析したところ、精製蛋白質はN末端付近に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、実験例1の蛋白質と同様の分子量、生物作用を示した。

【0068】

【実施例A-5】

＜蛋白質の製造＞常法により、生後間もないハムスターの新生児にウサギ由来の抗胸腺血清を注射して免疫反応を減弱させた後、ハムスターの背部皮下にヒト顎下腺類表皮癌由来の上皮様細胞株の一種であるA-253細胞(ATCC HTB41)を約 5×10^5 個/匹注射移植し、通常一般の方法で3週間飼育した。そして、皮下に生じた腫瘍塊(約10g重)を摘出し、常法により生理食塩水中で分散させた後、PBSで洗浄した。

【0069】得られた増殖細胞を10mM塩化カリウム、1.5mM塩化マグネシウム及び0.1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩をそれぞれ含む20mMヘペス緩衝液(pH7.4)で洗浄し、新鮮な同一緩衝液に細胞密度約 2×10^5 個/mlになるように浮遊させ、ホモゲナイザーにより破碎し、遠心分離により細胞残渣を除去して得られた上清を限外濾過膜により濃縮して免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質を含む細胞抽出液を得た。この細胞抽出液を実施例A-1の方法により精製し、濃縮し、凍結乾燥したところ、精製蛋白質の固状物がハムスター1匹当たり約3 50 μ gの収量で得られた。

【0070】その後、精製蛋白質の一部をとり、実験例2乃至4の方法に準じて分析したところ、精製蛋白質はN末端付近に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、実験例1の蛋白質と同様の分子量、生物作用を示した。

【0071】

【実施例A-6】

＜蛋白質の製造＞10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)を用い、A-253細胞を常法にしたがって単層状態になるまで37℃で培養した後、ギブコ製トリプシン製剤『トリプシン-EDTA』により増殖細胞を培養器から剥離させ、PBSにより洗浄した。以後、実施例A-1の方法に準じて、増殖細胞を破碎し、破碎物を遠心分離して得られた上清を37℃で6時間インキュベートした後、精製し、濃縮し、凍結乾燥したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質の精製固状物が細胞10⁵個当たり約1 50 μ gの収量で得られた。

【0072】その後、精製蛋白質の一部をとり、実験例2乃至4の方法に準じて分析したところ、精製蛋白質はN末端付近に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、実験例1の蛋白質と同様の分子量、生物作用を示した。

【0073】

【実施例A-7】

＜蛋白質の製造＞10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)を用い、A-253細胞を常法にしたがって単層状態になるまで37℃で培養した後、培養培地を血清無含有のRPMI1640培地(pH7.4)に取替え、誘導剤としてKG-1細胞由来の天然型ヒトIFN- γ を10IU/mlになるように加え、37℃でさらに48時間培養した。培養物を遠心分離し、得られた上清を実施例A-1の方法により精製し、濃縮し、凍結乾燥したところ、免疫担当細胞にIFN- γ の産生を誘導する蛋白質の精製固状物が細胞10⁵個当たり約5ngの収量で得られた。

【0074】その後、精製蛋白質の一部をとり、実験例2乃至4の方法に準じて分析したところ、精製蛋白質は

N末端付近に配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、実験例1の蛋白質と同様の分子量、生物作用を示した。

【0075】

【実施例A-8】

＜蛋白質の製造＞実施例A-1の方法により得た精製蛋白質を適量の滅菌蒸留水に溶解し、溶液を予め0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液により平衡化させておいた昭和電工製高速液体クロマトグラフィー用ゲル『アサヒバックC4P-50 4E』のカラムに負荷し、カラムを0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液により洗浄した後、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含み、アセトニトリルの濃度が0% (v/v) から90% (v/v) に直線的に上昇するトリフルオロ酢酸/アセトニトリル水混液を60ml/時間の流速で通液した。溶出画分から免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質を含む画分を採取し、1Mトリス水溶液 (pH11.2) により中和し、常法にしたがって濃縮し、アセトニトリルを除去したところ、純度約95%以上の濃縮蛋白質が原料蛋白質固形分当たり約10%の収量で得られた。

【0076】その後、この濃縮蛋白質の一部をとり、実験例2の方法に準じて分析したところ、分子量18,400 \pm 1,000ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある蛋白質の単一バンドを示した。さらに、実験例3及び4の方法に準じて分析したところ、濃縮蛋白質はC末端付近に配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を有するとともに、N末端付近に配列表における配列番号1、詳細には、配列番号7に示すアミノ酸配列を、また、中間部に配列表における配列番号4及び5に示すアミノ酸配列をそれぞれ有し、高純度に濃縮した場合においても、実験例1の蛋白質と同様の生物作用を示した。

【0077】

【実施例B-1】

＜液剤＞安定剤として1% (w/v) ヒト血清アルブミンを含む生理食塩水に実施例A-1の方法により得た精製蛋白質を1mg/mlになるように溶解し、常法にしたがって精密濾過により除菌して液剤を得た。

【0078】安定性に優れた本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症及び免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための注射剤、点眼剤及び点鼻剤として有用である。

【0079】

【実施例B-2】

＜乾燥注射剤＞安定剤として1% (w/v) 精製ゼラチンを含む生理食塩水100mlに実施例A-2の方法により得た精製蛋白質を100mg溶解し、常法にしたがって精密濾過により除菌し、バイアル瓶に1mlずつ分注し、凍結乾燥後、密栓した。

【0080】安定性に優れた本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症及び免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための乾燥注射剤として有用である。

【0081】

【実施例B-3】

＜乾燥注射剤＞実施例A-5の方法により得た精製蛋白質と、安定剤として林原製結晶トレハロース粉末『トレハオース』をそれぞれ用いた以外は実施例B-2と同様にして固形製剤を得た。

【0082】安定性に優れた本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症及び免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための乾燥注射剤として有用である。

【0083】

【実施例B-4】

＜軟膏剤＞滅菌蒸留水に和光純薬工業製カルボキシビニルポリマー『ハイビスワコー104』と林原製結晶トレハロース粉末『トレハオース』をそれぞれ濃度1.4% (w/w) 及び2.0% (w/w) になるように溶解し、実施例A-3の方法により得た精製蛋白質を均一に混合後、pH7.2に調整して、1g当たり精製蛋白質を約1mg含むペースト状物を得た。

【0084】延展性と安定性に優れた本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症及び免疫疾患を含む感受性疾患の治療・予防するための軟膏剤として有用である。

【0085】

【実施例B-5】

＜錠剤＞林原製無水結晶 α -マルトース粉末『ファイントース』に実施例A-4の方法により得た精製蛋白質と細胞賦活剤としてのルミンを均一に混合し、得られる混合物を常法により打錠して製品1錠 (約200mg) 当たり精製蛋白質及びルミンをそれぞれ約1mg含む錠剤を得た。

【0086】摂取性、安定性に優れ、細胞賦活作用も有する本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症及び免疫疾患を含む感受性疾患を治療・予防するための錠剤として有用である。

【0087】

【実施例B-6】

＜養子免疫療法剤＞悪性リンパ腫患者の末梢血から単核球を単離し、37℃に予温した10% (v/v) ヒトA/B血清を補足したRPMI1640培地 (pH7.2) に細胞密度約 1×10^4 個/mlになるように浮遊させ、実施例A-1の方法により得た精製蛋白質を約10ng/mlと組換え型ヒトインターロイキン2を約100単位/ml加え、5%CO₂インキュベータ中、37℃で1週間培養した後、遠心分離によりLAK細胞を採取した。

【0088】このLAK細胞は、元の悪性リンパ腫患者の体内に移入すると、リンパ腫細胞に顕著な細胞障害性

を示し、インターロイキン2のみ用いる養子免疫療法と比較して有意に高い治療効果を発揮する。なお、ヒト単核球に代えて腫瘍組織浸潤リンパ球を同様に処置して得られる細胞障害性T細胞も、元の患者の体内に移入すると、LAK細胞と同様の効果を発揮する。本例の養子免疫療法剤は、悪性リンパ腫以外に、例えば、悪性腎腫瘍、悪性黒色腫、大腸癌、肺癌などの固形悪性腫瘍にも有利に適用できる。

【0089】

【発明の効果】以上説明したごとく、この発明は免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する新規な蛋白質と、その蛋白質を産生し得るヒト細胞の発見に基づくものである。この発明の蛋白質はアミノ酸配列の一部までが解明された物質であり、免疫担当細胞において安定したIFN- γ 誘導能を発揮する。これにより、この発明の蛋白質は細胞培養によりIFN- γ を製造するためのIFN- γ 誘導剤として、さらには、IFN- γ 感受性を有するウイルス性疾患、悪性腫瘍、免疫疾患一般に対する治療剤・予防剤として多種多様の用途を有することとなる。また、キラー細胞による細胞障害性の増強又はキラー細胞の生成を誘導する性質を兼備するこの発明の蛋白質を有効成分とする感受性疾患剤は、悪性腫瘍などの難治性疾患の治療に格別の効果を発揮する。

【0090】この発明の蛋白質は強力なIFN- γ 誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN- γ 産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することはない。したがって、この発明の蛋白質は、使用に際して用量を厳密に

配列

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	Asp
1			5					10						15		
Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr
		20					25					30				
Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	
35				40					45				50			

【0095】配列番号：3

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：C末端フラグメント

配列

Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp

配列

Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg
1				5					10				

【0097】配列番号：5

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

配列

管理しなくても、所望のIFN- γ 産生を迅速に誘導できる利点がある。特に、この発明の蛋白質はヒト細胞に由来するので、組換えDNA技術により人工的に創製したポリペプチドに比べて、医薬品に配合してヒトに投与したときの副作用や抗体産生の少ない特徴がある。

【0091】斯くも有用なる蛋白質は、ヒト細胞を利用するこの発明の製造方法により、所望量を容易に製造することができる。

【0092】この発明は斯くも顕著な作用効果を奏するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。

【0093】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser
1			5					10	

【0094】配列番号：2

配列の長さ：50

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

1		5						10	
---	--	---	--	--	--	--	--	----	--

【0096】配列番号：4

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

40 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

25

25

Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys

1

5

10

15

【0098】配列番号:6

配列の長さ:157

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:蛋白質

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp

1

5

10

15

Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr

20

25

30

Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met

35

40

45

50

Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys

55

60

65

Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu

70

75

80

85

Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe

90

95

100

Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser

105

110

115

Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu

120

125

130

135

Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val

140

145

150

Gln Asn Glu Asp

155

【0099】配列番号:7

配列の長さ:13

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:N末端フラグメント

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg

1

5

10

【0100】配列番号:8

配列の長さ:25

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln

1

5

10

15

Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys

20

25

【0101】配列番号:9

配列の長さ:18

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro

1

5

10

15

Gln

【0102】配列番号:10

配列の長さ:471

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

50 配列の種類:cDNA to mRNA

配列の特徴

起源

生物名：マウス

組織の種類：肝臓

配列の特徴

配列を表わす記号 : mat peptide

存在位置: 1...471

特徴を決定した方法：S

配列

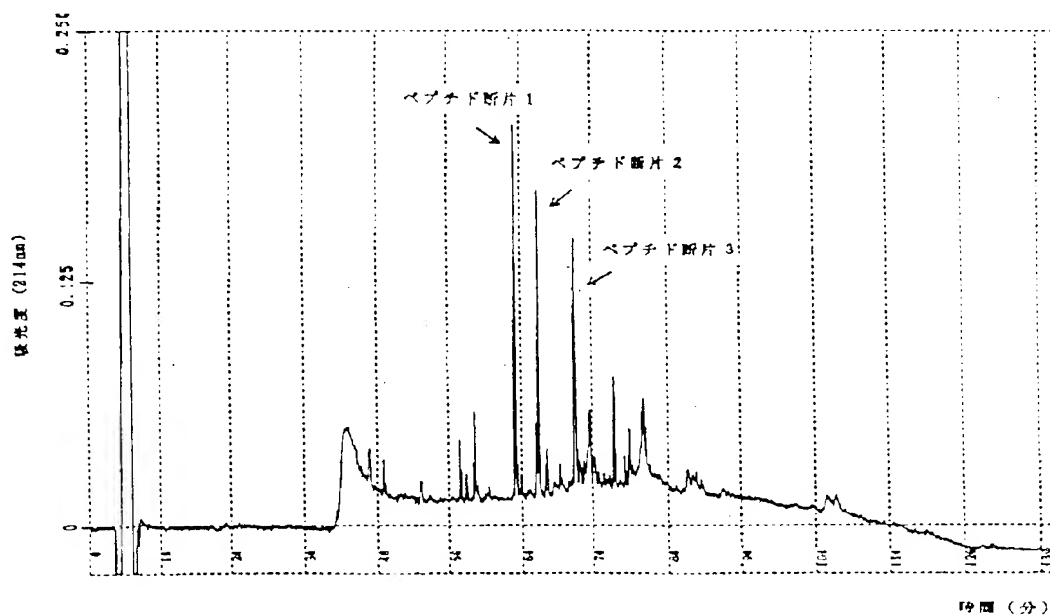
AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT	43
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn	
1 5 10 15	
GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG	96
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met	
20 25 30	
ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA	144
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile	
35 40 45	
TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT	192
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser	
50 55 60	
GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT	240
Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile	
65 70 75 80	
TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT	288
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser	
85 90 95	
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG	336
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu	
100 105 110	
TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA	384
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu	
115 120 125	
GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT	432
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp	
130 135 140	
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT	471
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser	
145 150 155	

【図面の簡単な説明】

る。

【図1】この発明による蛋白質のペプチド・マップであ

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. °

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

AFU

ADY

ADZ

AED

C07K 14/47

//C12P 21/02

C12R 1:91)

C12P 21/02

K

A61K 9/06

G

C07K 14/47

A61K 37/02

ABB

ABF

ABH

ADU

ADY

ADZ

AED

[Document name] Specification

[Title of the Invention] Protein which induces interferon- γ
production by immunocompetent cell

[Claims]

1. A protein of human cell origin, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 near at the N-terminus and induces the interferon- γ production by an immunocompetent cell.

2. The protein of claim 1, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 at the N-terminus.

3. The protein of claim 1 or 2, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:3 near at the C-terminus.

4. The protein of claim 1, 2 or 3, which has the amino acid sequences of SEQ ID NOs:4 and 5 as an internal fragment.

5. The protein of any one of claims 1 to 4, which has the amino acid sequence of SEQ ID NO:6 where the symbol "Xaa" is "isoleucine" or "threonine".

6. The protein of any one of claims 1 to 5, which has a molecular weight of 14,000-24,000 daltons on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

7. The protein of any one of claims 1 to 6, which enhances the cytotoxicity of and induces the formation of killer cells.

8. The protein of any one of claims 1-7, which is derived from a human hematopoietic cell.

9. A process for producing the protein of any one of claims 1 to 8, which comprises propagating a human cell which produces the protein, and collecting the produced protein from

the propagated cells.

10. The process of claim 9, wherein said human cell is a human hematopoietic cell.

11. The process of claim 9 or 10, which comprises transplanting the human cell to a warm-blooded animal excluding human, and propagating the cell while allowing to receive the body fluid of the animal.

12. The process of claim 11, wherein said animal is a rodent.

13. The process of any one of claims 9 to 12, wherein the propagated cells are disrupted, then the protein is collected from the resulting mixture.

14. The process of any one of claims 9 to 13, wherein said propagated cells are subjected to the action of an inducer.

15. The process of any one of claims 9 to 14, wherein the protein is collected by salting out, dialysis, filtration, concentration, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, absorption chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis and/or isoelectrophoresis.

16. An agent which contains the protein of any one of claims 1 to 8 as an effective ingredient.

17. The agent of claim 16, which additionally contains interleukin 2.

18. The agent of claim 16 or 17, which contains serum albumin, gelatin, trehalose and/or maltose as a stabilizer.

19. The agent of claim 16, 17 or 18, which is used

as an antioncotic agent.

20. The agent of claim 19, which is used as an agent for antitumor immunotherapy.

21. The agent of claim 16, 17 or 18, which is used as an antiviral agent.

22. The agent of claim 16, 17 or 18, which is used as an antibacterial agent.

23. The agent of claim 16, 17 or 18, which is used as an agent for immunopathy.

24. The agent of claim 23, which further contains interleukin 12.

25. The agent of claim 23 or 24, which is used for treating atopic diseases.

[Detailed Description of the Invention]

The present invention relates to a novel protein which induces the interferon- γ (hereinafter abbreviated as "IFN- γ ") production by immunocompetent cells.

[Description of the Prior Art]

It is known that IFN- γ is a protein which has antiviral-, antioncotic- and immunoregulatory-activities and is produced by immunocompetent cells that are stimulated with antigens or mitogens. Because of these biological activities, IFN- γ has been expected for use as an antitumor agent since it was discovered and studied energetically on clinical trials as a therapeutic agent for malignant tumors in general including brain tumors. IFN- γ preparations commercially available now are roughly classified into two groups, i.e. one group of natural IFN- γ s produced by immunocompetent cells and another group of

recombinant IFN- γ s produced by transformants, obtained by introducing DNAs which encode natural IFN- γ s into microorganisms of the species *Escherichia coli*. In the above clinical trials, one of these two groups of IFN- γ s is administered to patients as an "exogenous IFN- γ ".

Among these IFN- γ s, natural IFN- γ s are usually produced by culturing established immunocompetent cell lines in nutrient culture media admixed with IFN- γ inducers to produce IFN- γ s, and purifying the produced IFN- γ s from the resulting cultures. It is known that the type of IFN- γ inducers greatly influences on the IFN- γ yield, the facility of IFN- γ purification, and the safety of final IFN- γ preparations. Generally, mitogens such as concanavalin A (Con A), lentil lectin, pokeweed lectin, endotoxin and lipopolysaccharides can be used as IFN- γ inducers. However, these mitogens have problems that their molecules and qualities vary and change depending on their origins and purification methods, and preparations with a constant IFN- γ inducibility are not readily obtained in a satisfactory yield. In addition, most of these mitogens might induce unfavorable side effects when administered to living bodies, and some of them might cause toxicity, so that it is substantially difficult to induce IFN- γ production by directly administering IFN- γ inducers to the living bodies.

[Object of the Invention]

The present invention was made based on a novel protein which induces the interferon- γ production by immunocompetent cells. During the study of cytokines produced by mammalian cells, the present inventors noticed that the

existence of a substance which induces IFN- γ production in mouse liver cells which had been previously treated with a lipopolysaccharide and inactivated whole cells of *Corynebacterium*. They isolated the substance by a variety of purification methods using column chromatography as a main technique and studied the properties and features, and have found that the reality is a protein having the following physicochemical properties:

- (1) Molecular weight
19,000 \pm 5,000 daltons on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);
- (2) Isoelectric point (pI)
pI of 4.8 \pm 1.0 on chromatofocusing;
- (3) Partial amino acid sequence
Having the partial amino acid sequences of SEQ ID NOs:8 and 9; and
- (4) Biological activity
Inducing the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The data concluded that the substance is novel because no protein with these physicochemical properties is known. The present inventors continued studying on mouse liver cells and have succeeded to isolate a DNA which encodes the protein. The inventors decoded the DNA and have found that it consists of 471 base pairs and encodes the amino acid sequence of SEQ ID NO:10 (where the symbol "Xaa" means "methionine" or "threonine").

Based on these findings, the present inventors further

studied on human liver cells to obtain a DNA which encodes another novel substance that induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. They revealed that the reality is a polypeptide, then decoded the DNA and found that it has the amino acid sequence of SEQ ID NO:6 (where the symbol "Xaa" is "isoleucine" or "threonine"). They introduced the DNA into *Escherichia coli* to express the polypeptide and to produce it in the resulting culture in a satisfactorily high yield. These findings were disclosed in Japanese Patent Laid-Open Nos.27,189/96 and 193,098/96, applied by the present applicant. In Japanese Patent Application No.78,357/95 applied by the applicant, the polypeptide is disclosed as an agent for susceptible diseases. Although biologically active proteins which are administered to humans after mixed with pharmaceuticals should be generally human cell origin, no human cell which produces such a polypeptide is reported.

In view of the foregoing, the object of the present invention is to provide a protein of human cell origin, which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells.

The another object of the present invention is to provide a process for producing the protein.

The further object of the present invention is to provide the use of the protein as an agent for susceptible diseases.

[Means to attain the Object]

The first object of the present invention is attained by a protein of human cell origin which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells and has the amino acid

sequence of SEQ ID NO:1.

The second object of the present invention is attained by a process for producing the protein by propagating human cells which produce the protein, and collecting the protein from the propagated cells.

The third object of the present invention is attained by an agent for susceptible diseases, which contains the protein as an effective ingredient.

[Function]

The protein according to the present invention induces the IFN- γ production by immunocompetent cells when allowed to act on the cells alone or together with an appropriate cofactor.

The protein of human cell origin can be readily prepared by the present process using human cells.

The agent for susceptible diseases according to the present invention induces the IFN- γ production by immunocompetent cells in the human body when administered to humans, and exerts positive effects in the treatment and prevention of IFN- γ susceptible diseases. When the protein augments the cytotoxicity of killer cells or induces the formation of killer cells, it exerts positive effects on inveterate diseases including malignant tumors.

[Preferred Embodiments of the Invention]

The preferred embodiments according to the present invention will be described hereinafter. The wording "protein" as referred to in the present invention means polypeptides and glycoproteins in general which induce the IFN- γ production by immunocompetent cells and have the amino acid sequence of SEQ

ID NO:1. Depending on the types and propagation conditions of human cells, the protein has the amino acid sequences of SEQ ID NOs:1 and 3 near at the N- and C-termini, respectively, and occasionally has the amino acid sequence of SEQ ID NO:6, as a complete amino acid sequence, including the amino acid sequences of SEQ ID NOs:4 and 5 as an internal fragment (where the symbol "Xaa" means "isoleucine" or "threonine"). The protein is detected as a protein band at a position corresponding to a molecular weight of 14,000-24,000 daltons, usually, 18,000-19,500 daltons when determined on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in the presence of a reducing agent. Depending on the types and propagating conditions of human cells, one or more amino acids may be added to the above N- and/or C-termini of SEQ ID NOs:1 and 3 or one or more amino acids in the N- and/or C-termini may be defected. Any protein can be used in the present invention as long as it is derived from a human cell, as well as having either of these amino acid sequences and inducing the IFN- γ production when acting on immunocompetent cells alone or together with an appropriate cofactor.

These proteins can be produced by the present process using human cells. Usually, the human cells used in the present invention include cell lines derived from human hematopoietic cells such as lymphoblasts, lymphocytes, monoblasts, monocytes, myeloblasts, myelocytes, granulocytes and macrophages. Examples of these cell lines are lymphomas and leukemias such as myelocytic leukemia, promyelocytic leukemia, adult T-cell leukemia, and hairy cell leukemia, specifically, HBL-38 cell,

HL-60 cell (ATCC CCL240), K-562 (ATCC CCL243), KG-1 cell (ATCC CCL246), Mo cell (ATCC CRL8066), THP-1 cell (ATCC TIB202), and U-937 cell (ATCC CRL1593) as reported by Jun MINOWADA in "Cancer Review", Vol.10, pp.1-18 (1988), and A-253 cell (ATCC HTB41), an epidermoid carcinoma, submaxillary gland, human. Mutants of these cell lines can be also used in the present invention. Because these cell lines readily proliferate and more produce the present protein, they can be advantageously used in the present invention. Especially, epidermoid carcinoma cell lines such as A-253 cell, and human myelomonocytic cell lines such as HBL-38 cell, HL-60 cell, KG-1 cell, THP-1 cell, and U-937 cell have an extremely high productivity of the present protein and are most satisfactorily used in the present invention.

In the present process, the above human cells are first allowed to propagate, then the present protein is collected from the propagated cells. The method used to propagate these human cells in the present invention is not specifically restricted, and any conventional *in vivo* or *in vitro* propagation method can be used. The *in vivo* propagation method means a method to propagate cells using nutrient culture media, which comprises suspending human cells in RPMI 1640 medium, MEM medium and DEM medium, which are used conventionally to propagate animal cells in this field, supplemented with 0.3-30 w/v % of fetal bovine serum to give a cell density of about 1×10^4 - 1×10^7 cells/ml, preferably, about 1×10^5 - 1×10^6 cells/ml, and culturing these cells at a temperature of 36-38°C, preferably, a temperature of about 37°C and at a pH of 7-8, preferably, a pH of 7.2-7.4, for about 1-7 days while replacing these media

with fresh ones. Thereafter, the propagated cells were separated from the cultures to obtain the objective protein. Depending on the types and culture conditions of human cells, some cells extracellularly excrete the present protein while culturing. When coexisted in culture media inducers such as mitogens and/or IFN- γ s which induce the production of the present protein by the human cells, most of or all of the protein may be produced extracellularly. In this case, the protein can be collected from the culture supernatants.

The *in vivo* propagation method for human cells using warm-blooded animals excluding human comprises injecting to suppress the immunoreaction of the animals antilymphocyte antibodies derived from rabbits into rodents such as new born mice, nude mice, rats, nude rats, guinea pigs, and hamsters, injecting subcutaneously or intraperitoneally about 1×10^5 - 1×10^8 cells/animal of the human cells into the animals or placing the human cells in diffusion chambers embedded in or out of the animals' body while allowing the animals' body fluid to circulate in the chambers, and feeding the animals by conventional methods for about 2-10 weeks. During the feeding, the human cells propagate while receiving the animals' body fluid. The propagated human cells are collected in the form of a tumor mass, ascites or cell suspension. If necessary, the objective protein is collected after suspending and washing these human cells in and with an appropriate solvent. The *in vivo* propagation method has a merit that as compared with the *in vitro* propagation method it yields the present protein at a less labor cost and time and in a satisfactorily high yield.

The *in vivo* propagation method is disclosed, for example, in Japanese Patent Publication No.54,158/81.

To collect the present protein from the propagated cells, these cells are disrupted by ultrasonic before or after separating the objective protein from the cultures, homogenizing, freezing and thawing, or by soaking these cells in considerably-low osmotic solvents, then the protein is collected from the resulting cell debris or from a mixture of cell debris and culture supernatant. To collect the protein from the cell debris or the mixture, the cell debris or the mixture can be subjected directly or after incubation at about 37°C for 1-24 hours to the following conventional methods for purifying biologically active substances in this field: salting out, dialysis, filtration, concentration, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, adsorption chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis and/or isoelectrophoresis. Two or more of these conventional methods can be selectively used in combination. The collected protein can be concentrated and/or lyophilized into a liquid or solid form to meet to final use. The monoclonal antibody as disclosed in Japanese Patent Application No.58,240/95 applied by the present applicant is advantageously used to purify the present protein. Immunoaffinity chromatography using the monoclonal antibody yields the highest possible purity of the protein at the lowest cost and labor.

As is described above, the protein according to the present invention has a property of inducing the IFN- γ

production by immunocompetent cells. Thus it can be satisfactorily used as an inducer for IFN- γ production by cell culture methods and used in the treatment and prevention of IFN- γ susceptible diseases including viral diseases such as AIDS and condyloma acuminatum; infectious diseases such as candidosis, malaria, cryptococcosis, and *Yersinia*; malignant tumors such as malignant nephroma, granuloma, mycosis fungoides, and brain tumor; and immunopathies such as articular rheumatism and allergosis.

The present protein is usually added to nutrient culture media for IFN- γ production by culturing immunocompetent cells or administering to humans to treat and/or prevent IFN- γ susceptible diseases. In the former case, leukocytes separated from mammalian peripheral blood and established cell lines of immunocompetent cells such as HBL-38 cell, Mo cell (ATCC CRL8066), Jurkat cell (ATCC CRL8163), HuT78 cell (ATCC T1B161), EL4 cell (ATCC T1B39), L12-R4 cell, and mutants thereof are suspended in culture media containing about 0.1-1,000 ng/ml of the present protein, preferably, about 1-100 ng/ml of the protein. If necessary, these cells are cultured in nutrient culture media supplemented with T-cell stimulants such as mitogen, interleukin 2, and anti-CD3 antibody for about 1-100 hours in conventional manner while replacing the culture media with fresh ones. From the resulting cultures the present protein can be collected by one or more conventional methods used to purify IFN- γ such as salting out, dialysis, filtration, concentration, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic

chromatography, adsorption chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis and isoelectrophoresis.

Because the present protein induces the IFN- γ production by human immunocompetent cells, agents for susceptible diseases containing the protein as an effective ingredient stimulate the human immunocompetent cells to produce IFN- γ by administering to humans, and exert positive effects on the treatment and/or the prevention of IFN- γ susceptible diseases. Killer cells participate in the treatment and/or the prevention of susceptible diseases when the present protein induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, accelerates the cytotoxicity of killer cells such as cytotoxic T-cells and lymphokine activating killer cells including NK- and LAK-cells, and induces the formation of killer cells similarly as the proteins in the later described Experiments and Examples. The wording "susceptive diseases" as referred to in the present invention means diseases in general including IFN- γ susceptible diseases, which can be treated and/or prevented by IFN- γ s and/or killer cells: For example, viral diseases such as hepatitis, herpes, condyloma acuminatum, and AIDS; microbism such as candidiasis and malaria; malignant solid tumors such as malignant tumor, mycosis fungoides, and chronic granulomatous disease; hematopoietic malignant tumors such as adult T-cell leukemia, chronic myelocytic leukemia, and malignant tumor; and immunopathies such as allergosis and rheumatism. When used with interleukin 3, the present protein positively effects on the complete cure or the remission of leukopenia and

thrombocytopenia induced by radio- and chemo-therapies to treat leukemia, myeloma, and malignant tumors.

The present agent for susceptible diseases is widely used in the treatment and/or the prevention of the above susceptible diseases as an antitumor agent, antiviral agent, antiseptic, immunotherapeutic agent, platelet-increasing agent, or leukocyte-increasing agent. Depending on the type of agent and the symptom of susceptible diseases to be treated, the present agent is generally processed into a liquid, paste or solid form which contains 0.000001-100 w/w %, preferably, 0.0001-0.1 w/w % of the protein, on a dry solid basis (d.s.b.).

The present agent can be used intact or processed into compositions by mixing with physiologically-acceptable carriers, adjuvants, excipients, diluents and/or stabilizers, and, if necessary, further mixing with one or more other biologically-active substances such as interferon- α , interferon- β , interleukin 2, interleukin 3, interleukin 12, TNF- α , TNF- β , carboquone, cyclophosphamide, aclarubicin, thiotepa, busulfan, ancitabine, cytarabine, 5-fluorouracil, 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furyl)uracil, methotrexate, actinomycin D, chromomycin A₃, daunorubicin, doxorubicin, bleomycin, mitomycin C, vincristine, vinblastine, L-asparaginase, radio gold colloidal, Krestin[®], picibanil, lentinan, and Meruyama vaccine. Among these combinations, a combination of the present protein and interleukin 2 is especially useful because interleukin 2 acts as a cofactor for the protein when the protein induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. Another combination of the protein and a natural or recombinant human interleukin 2 induces

a relatively high level of IFN- γ production with only a small amount of the protein which does not substantially induce the IFN- γ production by immunocompetent cells. While a combination of the protein and interleukin 12 induces a greater level of IFN- γ production which could not be readily attained by them each. Because the present protein increases the activity of interleukin 12 to inhibit the production of immunoglobulin E antibody in the human body, the protein is advantageously used as an agent for immunopathies such as atopic diseases including atopic asthma, atopic bronchial asthma, hay fever, allergic rhinitis, atopic dermatitis, angioedema, and atopic digestive system's disorder. Occasionally a relatively small amount of interleukin 12 exists in humans. In this case, a sole administration of the protein to humans can attain the desired effect.

The form of the present agent for susceptible diseases includes those in a unit dose form which means a physically formulated medicament suitable for administration and contains the protein in an amount from 1/40 to several folds, i.e. up to 4 folds of a dosage. Examples of these are injections, liquids, powders, granules, tablets, capsules, sublinguals, ophthalmic solutions, nasal drops, and suppositories.

The present agent can be orally or parenterally administered to patients, and as described below it can be used to activate antitumor cells *in vitro*. In both administrations, the agent exerts a satisfactory effect in the treatment and/or the prevention of susceptible diseases. Varied depending on the types of susceptible diseases and the symptoms of patients before

and after the administration, the agent is orally administered to the patients or parenterally administered to the patients' intradermal- and subcutaneous-tissues, muscles, and veins at a dose of about 0.1 μ g to 50 mg per shot, preferably, about one μ g to one mg per shot, 1-4 times/day or 1-5 times/week, for one day to one year.

The present agent can be also used in so called "antitumor immunotherapy" using interleukin 2. Generally, the antitumor immunotherapy is roughly classified into (i) a method for directly administering interleukin 2 to patients with malignant tumors, and (ii) a method for introducing antitumor cells which are previously activated *in vitro* by interleukin 2, i.e. an adoptive immunotherapy. The present protein significantly enhances the above immunotherapeutic effect by interleukin 2 when used in combination. In the method (i), the protein is administered to patients in an amount of about 0.1 μ g/shot/adult to one mg/shot/adult at 1-10 times before the administration of interleukin 2 or at the same time. The dose of interleukin 2 is generally about 10,000-1,000,000 units/shot/adult, though it varies depending on the types of malignant tumors, patients' symptoms, and the dose of the present protein. In the method (ii), mononuclear cells and lymphocytes, collected from patients with malignant tumors, are cultured in the presence of interleukin 2 and about 0.1 ng to one μ g of the protein per 1×10^6 cells of the blood cells. After culturing for a prescribed period of time, NK cells or LAK cells are collected from the culture and introduced into the same patients. Diseases which can be treated by the present

antitumor immunotherapy are, for example, hematopoietic malignant tumors such as leukemia and malignant lymphoma, and solid malignant tumors such as colonic cancer, rectal cancer, large intestinal cancer, gastric cancer, thyroid carcinoma, cancer of the tongue, bladder carcinoma, choriocarcinoma, hepatoma, prostatic cancer, carcinoma uteri, laryngeal, lung cancer, breast cancer, malignant melanoma, Kaposi's sarcoma, cerebral tumor, neuroblastoma, tumor of the ovary, testicular tumor, osteosarcoma, cancer of the pancreas, renal cancer, hypernephroma, and hemangioendothelioma.

The following experiments explain the present protein:

Experiment 1

Preparation of protein

New born hamsters were suppressed their immunoreaction in conventional manner by injecting a rabbit antiserum to hamster antithymus into the hamsters, transplanted to their dorsal subcutaneous tissues with about 5×10^5 cells/hamster of THP-1 cells (ATCC TIB202), a myelomonocytic cell line of a human acute monocytic leukemia, and fed for 3 weeks in conventional manner. Tumor masses formed in their subcutaneous tissues, about 15 g weight per hamster, were extracted, dispersed in conventional manner in physiological saline, and washed with phosphate buffered saline (hereinafter abbreviated as "PBS").

The propagated cells thus obtained were washed with 10-fold volumes of cold 20 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 10 mM potassium chloride, 1.5 mM magnesium chloride, and 0.1 mM disodium ethylenediaminetetraacetate, allowed to stand in 3-fold volumes of a fresh preparation of the same buffer under ice-

chilled conditions, freezed at -80°C , and thawed to disrupt the cells. The disrupted cells were centrifuged to obtain a supernatant which was then fed to a column packed with "DEAE-SEPHAROSE", a gel for ion-exchange column chromatography commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 6.6), followed by washing the column with 10 mM phosphate buffer (pH 6.6), feeding to the column with a gradient buffer of sodium chloride which increases stepwisely from 0 M to 0.5 M in 10 mM phosphate buffer (pH 6.6), and collecting a fraction eluted at about 0.2 M sodium chloride.

The fraction was dialyzed against 10 mM phosphate buffer (pH 6.8) and fed to a column packed with "DEAE 5PW", a gel for ion-exchange chromatography commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, followed by feeding to the column a gradient buffer of sodium chloride which increases stepwisely from 0 M to 0.5 M in 10 mM phosphate buffer (pH 6.8), and collecting fractions eluted at about 0.2-0.3 M sodium chloride.

The resulting fractions were pooled, then dialyzed against PBS, fed to a plastic cylindrical column packed with a gel for immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody which had been prepared according to the method as disclosed in Japanese Patent Application No.58,240/95 applied by the present applicant, and washed with PBS. The column was fed with 100 mM glycine-HCl buffer (pH 2.5) to collect from the eluate fractions containing a protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. These fractions were pooled, dialyzed against sterile distilled water, concentrated

with a membrane filter, and lyophilized to obtain a purified solid protein in a yield of about 50 ng per hamster.

Experiment 2

Molecular weight

In accordance with the method reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol.227, pp.680-685 (1970), a purified protein prepared by the method in Experiment 1 was electrophoresed on a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) in the presence of 2 w/v % dithiothreitol, resulting in a main protein band with an IFN- γ inducibility at a position corresponding to about 18,000-19,500 daltons. The marker proteins used in this experiment were bovine serum albumin (MW=67,000 daltons), ovalbumin (MW=45,000 daltons), carbonic anhydrase (MW=30,000 daltons), soy bean trypsin inhibitor (MW=20,100 daltons), and α -lactalbumin (MW=14,400 daltons).

Experiment 3

Amino acid sequence and peptide mapping near at the N-terminus

Experiment 3-1

Amino acid sequence near at the N-terminus

The purified protein in Experiment 1 was analyzed on "MODEL 473A", a protein sequencer commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and revealed that it has the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, particularly, SEQ ID NO:2.

Experiment 3-2

Peptide mapping

A purified protein obtained by the method in Experiment 1 was dissolved in an adequate amount of sterile

distilled water, and the solution was fed to a column packed with "ASAHI[®]PAK C4P-50 4E", a gel for high-performance liquid chromatography (HPLC) commercialized by Showa Denko, K.K., Tokyo, Japan, which had been previously equilibrated with 0.1 v/v % aqueous trifluoroacetic acid solution, followed by washing the column with 0.1 v/v % aqueous trifluoroacetic acid solution and feeding to the column a linear gradient solution of acetonitrile increasing from 0 v/v % to 90 v/v % in a mixture solution of trifluoroacetic acid and acetonitrile at a flow rate of 60 ml/hour. Fractions containing a protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells were collected from the eluted fractions, pooled, neutralized with 1 M aqueous tris solution (pH 11.2), and concentrated in conventional manner. To 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), dissolving an adequate amount of clostripain commercialized by Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA, was added the protein in an amount of about 50 folds of the clostripain by molar ratio while removing acetonitrile, and the resulting mixture was allowed to react at a pH of 8-9 and at 37°C for 12 hours to obtain a reaction mixture containing fragments of the protein.

The reaction mixture was fed to a column packed with "ODS-120T", a gel for HPLC commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, which had been previously equilibrated with 0.1 v/v % aqueous trifluoroacetic acid solution, followed by washing the column with 0.1 v/v % aqueous trifluoroacetic acid solution and feeding to the column a linear gradient solution of acetonitrile increasing from 0 v/v % to 70 v/v % in a mixture solution of trifluoroacetic acid, acetonitrile and water where

the concentration of trifluoroacetic acid was 0.09 v/v % at a flow rate of 30 ml/hour while monitoring the absorption level of the peptide, i.e. the concentration of the peptide, at a wave length of 214 nm. FIG.1 is the resulting peptide map.

In FIG.1, peptide fragments eluted at about 59, 62 and 68 min after initiating the elution are respectively named peptide fragments 1, 2 and 3. These peptide fragments were separately collected and analyzed for amino acid sequence on "MODEL 473A", a protein sequencer commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, in conventional manner. As a result, it was revealed that the peptide fragments 1 and 2 have the amino acid sequences of SEQ ID NOs:3 and 7, respectively, while the peptide fragment 3 has those of SEQ ID NOs:4 and 5. The comparison of these amino acid sequences with the one of SEQ ID NO:6 revealed that the peptide fragments 1 to 3 correspond to the positions 148-157, 1-13 and 45-58 or 80-96 in the amino acid sequence of SEQ ID NO:6, respectively. These results confirmed that the peptide fragments 1 and 2 correspond to the C- and N-terminal fragments of the protein used for analysis, and the peptide fragment 3 corresponds to an internal fragment of the protein.

It is concluded that the purified protein obtained by the method in Experiment 1 contains the amino acid sequence of SEQ ID NO:6 when totally evaluating these results, the fact as revealed in Experiment 2 that the purified protein has a main protein band at a position corresponding to a molecular weight of about 18,000-19,500 daltons on SDS-PAGE, and the fact that the purified protein is calculated to have a molecular weight

of 18,199 daltons from the amino acid sequence of SEQ ID NO:6.

Experiment 4

Biological activity

Experiment 4-1

IFN- γ production by immunocompetent cell

Blood was sampled from a healthy volunteer by a heparinized syringe and diluted by 2-fold with serum free RPMI 1640 medium (pH 7.4). The diluted blood was overlaid on a ficoll commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, followed by centrifugation to collect lymphocytes. These lymphocytes were washed with RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % fetal bovine serum and suspended in a fresh preparation of the same medium to give a cell density of 5×10^6 cells/ml. The cell suspension was distributed to a 96-well microplate in a volume of 0.15 ml/well.

A purified protein obtained by the method in Experiment 1 was diluted with RPMI 1640 (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % fetal bovine serum, and the dilution was distributed to the microplate in a volume of 0.05 ml/well. To the microplate was added a fresh preparation of the same buffer either with or without 2.5 μ g/ml Con A or 50 units/ml of a recombinant human interleukin 2 in a volume of 0.05 ml/well, and the microplate was incubated at 37° C for 24 hours in a 5 v/v % CO₂ incubator. After completion of the culture, 0.1 ml of a culture supernatant was sampled from each well and assayed for IFN- γ activity by conventional enzyme immunosorbent assay (EIA). As a control, a system free of the purified protein was provided and treated similarly as above. The results were in Table 1

where the IFN- γ content was assayed and expressed in terms of international unit (IU) with respect to "Gg23-901-530", an international standard for IFN- γ obtained from the National Institute for Health, Bethesda, MD, USA.

Table 1

Protein concentration (ng/ml)	IFN- γ yield (IU/ml)		
	Protein	Protein plus Con A	Protein plus interleukin 2
0	<0.5	<2	<0.5
0.32	<0.5	6 \pm 2	2 \pm 1
1.6	10 \pm 2	70 \pm 20	60 \pm 20
8	140 \pm 10	490 \pm 80	570 \pm 30
40	180 \pm 20	620 \pm 10	880 \pm 50
200	260 \pm 20	800 \pm 20	1500 \pm 400

Note : In the table, the wording "protein" means the present protein.

The results in Table 1 show that lymphocytes as an immunocompetent cell produced IFN- γ by the action of the present protein. As is evident from the results, the IFN- γ production is increased in the presence of interleukin 2 or Con A as a cofactor.

Experiment 4-2

Increase of cytotoxicity by NK cell

Blood was sampled from a healthy volunteer by a heparinized syringe and diluted with PBS by 2-fold. The dilution was overlaid on a ficoll, and the resultant was centrifuged to obtain a high density layer of lymphocytes. The lymphocytes were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.2) containing 10 μ g/ml kanamycin, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol and 10 v/v fetal bovine serum, and the suspension was distributed to a 12-well microplate in a volume of 0.5 ml/well. A purified protein obtained by the method in Experiment 1 was appropriately diluted with a fresh preparation of the same buffer, and the dilution was distributed to the microplate in a volume of 1.5 ml/well, followed by adding to the microplate 0.5 ml/well of a fresh preparation of the same buffer either with or without 50 units/ml of a recombinant human interleukin 2, incubating the microplate at 37°C for 24 hours in a 5 v/v % CO₂ incubator, and washing the resultant cells with PBS to obtain cultured lymphocytes containing NK cells as an effector cell. 1×10^4 cells/well aliquots of K-562 cells (ATCC CCL243), derived from human chronic myelocytic leukemia as a NK-cell susceptible target cell, which had been labelled with ⁵¹Cr in conventional manner, were distributed to a 96-well microplate, and mixed with the

above NK cells in a ratio of 2.5:1, 5:1 or 10:1 (=(effector cells):(target cells)). The microplate was incubated at 37°C for 4 hours in a 5 v/v % CO₂ incubator, followed by counting the radio activity of each supernatant to count the dead target cells. In each system, the percentage (%) of the dead target cells with respect to the target cells used in this experiment was calculated for evaluating cytotoxicity. The results were in Table 2.

Table 2

Protein concentration (pM)	Concentration of interleukin 2	Cytotoxicity		
		Effector cells/Target cells		
		2.5/1	5/1	10/1
0	0	19	36	59
0	10	28	44	61
0.5	0	22	41	63
0.5	10	31	54	69
5	0	28	49	66
5	10	36	58	71
50	0	29	53	67
50	10	42	62	72
500	0	33	56	84
500	10	57	78	96

Note : In the table, the symbol "pM" means 10^{-12} M, and the wording "protein" means the present protein.

The results in Table 2 show that the protein according to the present invention has a property of enhancing the cytotoxicity by NK cells. As is evident from the results, the cytotoxicity is more enhanced by the coexisting interleukin 2.

Experiment 4-3

Induction of LAK cell formation

1×10^4 cells/well aliquots of Raji cell (ATCC CCL86), a human Burkitt's lymphoma as an NK-cell non-susceptive target cell labelled with ^{51}Cr in conventional manner were distributed to a 96-well microplate, and mixed with a cell suspension of the target cells and cultured lymphocytes containing LAK cells as an effector cell, prepared similarly by the method in Experiment 4-2 except for culturing 72 hours, in a ratio of 5:1, 10:1 or 20:1 (=(effector cells):(target cells)), followed by incubating the microplate at 37°C for 4 hours in a 5 v/v % CO_2 incubator and counting the radio activity of each supernatant in conventional manner. Thereafter, the cytotoxicity (%) was calculated similarly as in Experiment 4-2. The results were in Table 3.

Table 3

Protein concentration (pM)	Concentration of interleukin 2	Cytotoxicity		
		Effector cells/Target cells		
		5/1	10/1	20/1
0	0	12	23	31
0	10	14	25	35
0.5	0	14	24	34
0.5	10	18	32	42
5	0	16	26	37
5	10	21	36	50
50	0	22	41	49
50	10	26	52	56
500	0	27	44	61
500	10	33	59	72

Note : In the table, the symbol "pM" means 10^{-12} M, and the wording "protein" means the present protein.

The results in Table 3 show that the present protein has a property of inducing the LAK-cell formation. As is evident from these results, this induction is more enhanced by the coexisting interleukin 2.

Experiment 5

Acute toxicity test

A purified protein obtained by the method in Experiment 1 was injected percutaneously, orally or intraperitoneally into 8-week-old mice in conventional manner. As a result, the LD₅₀ of the protein was about one mg/kg mouse or higher independent of these administration routes. This evidences that the present protein is safe to incorporate into medicaments which are administrable to humans.

It is well known that IFN- γ deeply relates to the inhibition of bacterial infection and the propagation of malignant tumors, the regulation of human biophylaxis through the immunoregulatory function, and to the inhibition of immunoglobulin E antibody's production. As is described above, IFN- γ is now commercially available and used as an agent for human susceptible diseases, and the diseases to be treated, dose, administration, and safety are almost revealed. It is described in "*Cytokines in Cancer Therapy*", edited by Frances R. Balkwill, translated by Yoshihiko WATANABE, published by Tokyo-Kagaku-Dojin, Tokyo, Japan (1991) that treatments using killer cells such as NK- and LAK-cells are used as an antitumor immunotherapy and applied to human diseases, and reported that most of them exert a satisfactory therapeutic effect. Recently focussed is the relationship between the therapeutic effect and the

augmentation of killer cells' cytotoxicity or the induction of killer cells' formation using cytokines. For example, T. Fujioka et al. reported in "*British Journal of Urology*", Vol.73, No.1, pp.23-31 (1994) that interleukin 2 strongly induced the formation of LAK cells in an antitumor immunotherapy using LAK cells and interleukin 2, and exerted a satisfactory effect on the metastasis of human cancer without substantially inducing serious toxicity and side effects.

Thus it is revealed that IFN- γ and killer cells closely relate to the treatment and the prevention of human diseases for complete cure and remission. Under these backgrounds as shown in the results in Experiments 4 and 5, the fact that the present protein induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, enhances the NK cells' cytotoxicity, and induces the LAK cells' formation indicates that the present agent containing the protein can be administered to humans over a relatively long period of time and exerts a satisfactory therapeutic effect on the treatment and the prevention of IFN- γ and/or killer cell related diseases without substantially inducing serious side effects.

The following Examples explain the preferred embodiments of the present invention in more detail. Examples A-1 to A-8 are the preferred embodiments of the preparation of the present protein, and Examples B-1 to B-6 are the preferred embodiments of the present agent for susceptible diseases:

Example A-1

Preparation of protein

New born hamsters were suppressed their immunoreaction

in conventional manner by injecting a rabbit antiserum to hamster antithymus into the hamsters, transplanted to their dorsal subcutaneous tissues with about 5×10^5 cells/hamster of THP-1 cells (ATCC TIB202), a myelomonocytic cell line of a human acute leukemia, and fed for 3 weeks in conventional manner. Tumor masses, about 15 g weight each, subcutaneously formed in each hamster were extracted, suspended in physiological saline in conventional manner, and washed with PBS.

In accordance with the method by Matthew J. Kostura et al. in *"Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America"*, Vol.86, pp.5,227-5,231 (1989), the suspended cells were washed with 10-fold volumes of cold 20 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 10 mM potassium chloride, 1.5 mM magnesium chloride, 0.1 mM disodium ethylenediaminetetraacetate, allowed to stand in 3-fold volumes of a fresh preparation of the same buffer, allowed to stand for 20 min under ice-chilled conditions, lyophilized at -80°C , and thawed to disrupt cells. The disrupted cells were centrifuged, and the supernatant was fed to a column packed with "DEAE-SEPHAROSE", a gel for ion-exchange chromatography commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, followed by washing the column with 10 mM phosphate buffer (pH 6.6), fed with a gradient buffer of sodium chloride increasing stepwisely from 0 M to 0.5 M, and collecting fractions eluted at about 0.2 M sodium chloride.

The fractions were pooled, dialyzed against 10 mM phosphate buffer (pH 6.8), fed to a column packed with "DEAE 5PW", a gel for ion-exchange chromatography commercialized by

Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, which had been previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 6.8), fed with a linear gradient buffer of sodium chloride increasing from 0 M to 0.5 M in 10 mM phosphate buffer (pH 6.8), and collected fractions eluted at about 0.2-0.3 M sodium chloride.

The resulting fractions were pooled and dialyzed against PBS. The dialyzed inner solution was fed to a cylindrical plastic column prepared by first packing a gel for immunoaffinity chromatography of a monoclonal antibody, which had been prepared according to the method disclosed in Japanese Patent Application No.58,240/95 applied by the present applicant, then washing with PBS. One hundred mM glycine-HCl buffer (pH 2.5) was fed to the column to effect fractionation, followed by collecting fractions containing a protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells from the eluate, dialyzing the fractions against sterile distilled water, concentrating the dialyzed inner solution with a membrane filter, and lyophilizing the concentrate to obtain a solid purified protein. The yield was about 50 ng per hamster.

Example A-2

Preparation of protein

New born nude mice were injected into their dorsal subcutaneous tissues with about 1×10^6 cells/nude mouse of KG-1 cells (ATCC CCL246), a myelomonocytic cell line derived from human acute myelomonocytic leukemia, and fed for 4 weeks in conventional manner. Tumor masses, about 20 g weight each, formed subcutaneously in each nude mouse were extracted and dispersed in physiological saline in conventional manner. The

cells were washed and disrupted similarly as in Example A-1, and the resulting mixture was purified to obtain a purified protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells in a yield of about 20 ng per nude mouse.

A portion of the purified protein was analyzed for amino acid sequence in accordance with the method in Experiments 2-4, revealing that the protein has the partial amino acid sequence of SEQ ID NO:1 near at the N-terminus and a similar molecular weight and biological activity as the protein in Experiment 1.

Example A-3

Preparation of protein

HL-60 cells (ATCC CCL240), a myelomonocytic cell line derived from human acute promyelocytic leukemia, were suspended in RPMI 1640 (pH 7.4) placed in an about 10-ml plastic cylindrical diffusion chamber in which was installed a membrane filter with a diameter of 0.5 μ m, then the chamber was intraperitoneally embedded in an aged rat. The rat was fed for 4 weeks in conventional manner, then the chamber was removed. The propagated cells in the chamber were collected, washed with physiological saline, and disrupted similarly as in Example A-1, followed by purifying the resulting mixture to obtain a purified protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. The yield was about 20 ng per rat.

A portion of the purified protein was analyzed for amino acid sequence in accordance with the method in Experiments 2-4, revealing that the protein has the partial amino acid sequence of SEQ ID NO:1 near at the N-terminus and has a similar

molecular weight and biological activity to the protein in Experiment 1.

Example A-4

Preparation of protein

THP-1 cells (ATCC TIB202), a myelomonocytic cell line derived from human acute monocytic leukemia, were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.2) supplemented with 10 v/v % fetal bovine serum to give a cell density of about 3×10^5 cells/ml, and cultured at 37°C for 3 weeks in a 10 v/v % CO₂ incubator while replacing the medium with a fresh one. The propagated cells were separated from the resulting culture, washed with physiological saline, and disrupted similarly as in Example A-1, followed by purifying the resulting mixture to obtain a purified protein which induces the IFN- γ production in a yield of about 10 ng per litter of the culture.

A portion of the purified protein was analyzed for amino acid sequence in accordance with the method in Experiments 2-4, revealing that the protein has the partial amino acid sequence of SEQ ID NO:1 near at the N-terminus and has a similar molecular weight and biological activity to the protein in Experiment 1.

Example A-5

Preparation of protein

New born hamsters were immunosuppressed by injecting a rabbit antithymus serum in conventional manner, injected to the dosal subcutaneous tissues with about 5×10^5 cells/head of A-253 cells (ATCC HTB41), an epidermoid carcinoma, submaxillary gland, human, and fed for 3 weeks in usual manner. Thereafter,

the tumor masses formed subcutaneously, about 10 g weight in each hamster, were extracted, dispersed in physiological saline, and washed with PBS.

The propagated cells thus obtained were washed with 20 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 10 mM potassium chloride, 1.5 mM magnesium chloride, and 0.1 mM disodium ethylenediaminetetraacetate, suspended in a fresh preparation of the same buffer to give a cell density of about 2×10^7 cells/ml, disrupted by a homogenizer, and centrifuged to remove cell debris to obtain a supernatant, followed by concentrating the supernatant by a membrane for ultrafiltration to obtain a cell extract containing a protein which induces the interferon- γ production by immunocompetent cells. The extract was purified similarly as the method in Example A-1, concentrated, and lyophilized to obtain a solid purified protein in a yield of about 3 μ g of per hamster.

The purified protein was sampled and analyzed in accordance with the methods in Examples 2-4 revealing that it has the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 nearness to the N-terminus and has a similar molecular weight and biological activities to those of the protein in Experiment 1.

Example A-6

Preparation of protein

A seed culture of A-253 cell was inoculated into RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % fetal calf serum and cultured in conventional manner at 37°C until forming a monolayer of cells. Thereafter, the cells were detached from the surface of the culture vessel used by using "TRYPSIN-EDTA",

a trypsin commercialized by Gibuco BRL, NY, USA, and washed with PBS. In accordance with the method in Example A-1, the cells were disrupted, and the disrupted cells were purified and centrifuged to obtain a supernatant which was then incubated at 37°C for 6 hours, purified, concentrated, and lyophilized to obtain a solid purified protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells in a yield of about one μ g per 10^7 cells.

The supernatant was sampled and analyzed in accordance with the method in Experiments 2-4 revealing that it has the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 near at the N-terminus and has a similar molecular weight and biological activities to those of the protein in Experiment 1.

Example A-7

Preparation of protein

A seed culture of A-253 cell was inoculated into RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % fetal calf serum and cultured in conventional manner at 37°C until forming a monolayer of cells. Thereafter, the culture medium was replaced with a serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 IU/ml of a natural IFN- γ derived from KG-1 cell as an IFN- γ inducer, and incubated at 37°C for 48 hours. The culture was centrifuged to obtain a supernatant which was then purified by the method in Example A-1, concentrated, and lyophilized to obtain a solid purified protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells in a yield of about 5 ng per 10^7 cells.

The supernatant was sampled and analyzed in accordance

with the method in Experiments 2-4 revealing that it has the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 nearness to the N-terminus and has a similar molecular weight and biological activities to those of the protein in Experiment 1.

Example A-8

Preparation of protein

A purified protein obtained by the method in Example A-1 was dissolved in an adequate amount of sterile distilled water, and the solution was fed to a column packed with "ASAHI[®]PAK C4P-50 4E", a gel for high-performance liquid chromatography commercialized by Showa Denko K.K., Tokyo, Japan, which had been previously equilibrated with 0.1 v/v % aqueous trifluoroacetic acid, followed by washing the column with 0.1 v/v % aqueous trifluoroacetic acid and feeding to the column a linear gradient solution of acetonitrile increasing from 0 v/v % to 90 v/v % in a mixture solution of trifluoroacetic acid and acetonitrile at a flow rate of 60 ml/hour. Fractions containing a protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells were collected from the eluted fractions, pooled, neutralized with 1 M aqueous tris solution (pH 11.2), and concentrated in conventional manner, followed by removing acetonitrile from the resulting concentrate to obtain a concentrated protein with a purity of at least 95% in a yield of about 10% by weight with respect to the material protein, d.s.b.

in accordance with the method in Experiment 2, the concentrated protein was sampled and analyzed for molecular weight, resulting in a single protein band, which induces an

IFN- γ production, at a position corresponding to a molecular weight of $18,400 \pm 1,000$ daltons. Another fresh sample was analyzed for amino acid sequence in accordance with the method in Experiments 3 and 4, revealing that it has the amino acid sequence of SEQ ID NO:3 and the one of SEQ ID NO:1 near at the N-terminus, more particularly, the one of SEQ ID NO:7, and further it has the amino acid sequence of SEQ ID NOs:4 and 5 as an internal fragment and exhibited a similar biological activity to the protein of Experiment 1 even when concentrated into a relatively high level.

Example B-1

Liquid

A purified protein obtained by the method in Example A-1 was dissolved in physiological saline containing one w/v % human serum albumin as a stabilizer, followed by sterilely filtering the solution to obtain a liquid.

The product with a satisfactory stability can be used as an injection, collunarium or nebula to treat and/or prevent susceptible diseases such as malignant tumors, viral diseases, bacterial infections, and immunopathies.

Example B-2

Dried injection

A purified protein obtained by the method in Example A-2 was dissolved in physiological saline containing one w/v % of a purified gelatin as a stabilizer, and the solution was sterilely filtered in conventional manner. The sterile solution was distributed to vials by one ml and lyophilized, then the vials were cap sealed.

The product with a satisfactory stability can be used as a dried injection[, collunarium or nebula] to treat and/or prevent susceptible diseases such as malignant tumors, viral diseases, bacterial infections, and immunopathies.

Example B-3

Dry injection

A solid pharmaceutical was prepared similarly as in Example B-2 except for using a purified protein obtained by the method in Example A-5 and "TREHAOSE", a crystalline trehalose powder commercialized by Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japan, as a stabilizer.

The product with a satisfactorily stability can be advantageously used as a dry injection for treating and/or preventing malignant tumors, viral diseases, bacterial infections, and immunophathies.

Example B-4

Ointment

"HI-BIS-WAKO 104", a carboxyvinylpolymer commercialized by Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan, and "TREHAOSE", a crystalline trehalose powder commercialized by Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japan, were dissolved in sterile distilled water in respective amounts of 1.4 w/w % and 2.0 w/w %, and the solution was mixed to homogeneity with a purified protein obtained by the method in Example A-3, then adjusted to pH 7.2 to obtain a paste containing about one mg of a purified protein per g of the paste.

The product with a satisfactory spreadability and stability can be used as an ointment [injection, collunarium or

nebula] to treat and/or prevent susceptible diseases such as malignant tumors, viral diseases, bacterial infections, and immunopathies.

Example B-5

Tablet

A purified protein obtained by the method in Example A-4 and "LUMIN (1-1'-1''-triheptyl-11-chinoly(4)•4•4'-penthamethinchynocyanine-1-1''-dijodide)" as a cell activator were mixed to homogeneity with "FINETOSE[®]", an anhydrous crystalline α -maltose powder commercialized by Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japan, and the mixture was tabletted in conventional manner to obtain tablets, about 200 mg weight each, containing the purified protein and LUMIN in an amount of one mg each.

The product with a satisfactory swallowability, stability and cell-activating activity can be used as a tablet [injection, collunarium or nebula] to treat and/or prevent susceptible diseases such as malignant tumors, viral diseases, microbism, and immunopathies.

Example B-6

Agent for adoptive immunotherapy

Human monocytes were separated from peripheral blood of a patient with malignant lymphoma, suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.2), which had been supplemented with 10 v/v % human AB serum and preheated at 37°C, to give a cell density of about 1×10^6 cells/ml, mixed with about 10 ng/ml of a purified protein obtained by the method in Example A-1 and about 100 units/ml of a recombinant human interleukin 2, and incubated at 37°C for one

week, followed by centrifugally collecting LAK cells.

The LAK cells exerted a strong cytotoxicity on lymphoma cells when introduced into the patient, and the therapeutic effect is significantly higher than that of the conventional adoptive immunotherapy using interleukin 2 alone. Cytotoxic T-cells, obtained by treating a patient's tumor tissue invasive lymphocyte instead of the patient's monocytes, showed a similar effect as in the LAK cells when reintroduced into the patient. The agent for adoptive immunotherapy can be suitably applied to solid tumors such as malignant nephroma, malignant melanoma, large intestinal cancer, and lung cancer.

[Effect of the Invention]

As is described above, the present invention was made based on a novel protein which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells and a discovery of human cells which produce the protein. The protein with a partly revealed amino acid sequence stably induces the IFN- γ production by immunocompetent cells. Therefore, the protein can be used widely as an IFN- γ inducer for IFN- γ production by culturing cells, and a therapeutic and/or prophylactic agent for IFN- γ susceptible diseases such as viral diseases, malignant tumors, and immunopathies which are susceptible to IFN- γ . The present agent for susceptible diseases which contains the protein as an effective ingredient exerts an outstanding effect on the treatment of inveterate diseases such as malignant tumors.

Because the protein has a strong IFN- γ production inducibility and has a relatively low toxicity, it induces generally a desired level of IFN- γ production with only a small

amount and does not substantially cause serious side effects even when administered to patients at a relatively high dose. Therefore, the protein is advantageous in that it quickly induces a desired level of IFN- γ production without strictly controlling the dose. Especially, the present protein of human cell origin is advantageous in that it less causes side effects and less induces antibodies when administered to humans in the form of a pharmaceutical composition as compared with artificially produced polypeptides by the recombinant techniques.

The present protein having these satisfactory properties can be produced in a desired amount by the present process using human cells.

Thus the present invention with these significant functions and effects is a significant invention which greatly contributes to this field.

SEQUENCE LISTING

- (1) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:10 amino acids
 (B)TYPE:amino acid
 (D)TOPOLOGY:linear
 (ii)MOLECULE TYPE:peptide
 (v)FRAGMENT TYPE:N-terminal fragment
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:1:

SEQ ID NO:1:

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser
1			5					10	

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:50 amino acids

(B)TYPE:amino acid
 (D)TOPOLOGY:linear
 (ii)MOLECULE TYPE:peptide
 (v)FRAGMENT TYPE:N-terminal fragment
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:2:

SEQ ID NO:2:

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1				5				10						15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
			20					25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
		35					40					45			
Ile	Ser														
	50														

(3) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:10 amino acids
 (B)TYPE:amino acid
 (D)TOPOLOGY:linear
 (ii)MOLECULE TYPE:peptide
 (v)FRAGMENT TYPE:C-terminal fragment
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:3:

SEQ ID NO:3

Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp
1				5				10	

(4) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:14 amino acids
 (B)TYPE:amino acid
 (D)TOPOLOGY:linear
 (ii)MOLECULE TYPE:peptide
 (v)FRAGMENT TYPE:internal fragment
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:4:

SEQ ID NO:4

Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg
1				5					10				

(5) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:17 amino acids
 (B)TYPE:amino acid
 (D)TOPOLOGY:linear

(ii)MOLECULE TYPE:peptide
 (v)FRAGMENT TYPE:internal fragment
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:5:

SEQ ID NO:5

Ile	Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
1				5					10					15	
Lys															

(6) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:157 amino acids
 (B)TYPE:amino acid
 (D)TOPOLOGY:linear
 (ii)MOLECULE TYPE:protein
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:6:

SEQ ID NO:6

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
			20					25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
			35				40					45			
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
	50					55					60				
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Xaa	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
				85					90					95	
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
			100					105					110		
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
		115					120					125			
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
	130					135					140				
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp			
145					150					155					

(7) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:13 amino acids
 (B)TYPE:amino acid
 (D)TOPOLOGY:linear
 (ii)MOLECULE TYPE:peptide
 (v)FRAGMENT TYPE:[internal fragment] N-terminal fragment
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:7:

SEQ ID NO:7

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg
 1 5 10

- (8) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:25 amino acids
 (B)TYPE:amino acid
 (D)TOPOLOGY:linear
 (ii)MOLECULE TYPE:peptide
 (v)FRAGMENT TYPE:internal fragment
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:8:

SEQ ID NO:8

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile
 1 5 10 15
 Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys
 20 25

- (9)INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:18
 (B)TYPE:amino acid
 (D)TOPOLOGY:linear
 (ii)MOLECULE TYPE:peptide
 (v)FRAGMENT TYPE:internal fragment
 (xi)SLQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:9:

SEQ ID NO:9

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu
 1 5 10 15
 Pro Gln

- (10)INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:
 (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A)LENGTH:471 base pairs
 (B)TYPE:nucleic acid
 (C)strandedness:double
 (D)TOPOLOGY:linear
 (ii)MOLECULE TYPE:cdna to mRNA
 (vi)ORIGINAL SOURCE:
 (A)ORGANISM:mouse
 (B)INDIVIDUAL ISOLATE:liver
 (ix)FEATURE:
 (A)NAME/KEY:mat peptide
 (B)LOCATION:1..471
 (C)IDENTIFICATION METHOD:S
 (xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:10:

SEQ ID NO:10

AAC	TTT	GGC	CGA	CTT	CAC	TGT	ACA	ACC	GCA	GTA	ATA	CGG	AAT	ATA	AAT	48
Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn	
1				5					10					15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	GTT	GAC	AAA	AGA	CAG	CCT	GTG	TTC	GAG	GAT	ATG	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met	
		20						25					30			
ACT	GAT	ATT	GAT	CAA	AGT	GCC	AGT	GAA	CCC	CAG	ACC	AGA	CTG	ATA	ATA	144
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile	
		35					40					45				
TAC	ATG	TAC	AAA	GAC	AGT	GAA	GTA	AGA	GGA	CTG	GCT	GTG	ACC	CTC	TCT	192
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	
	50					55				60						
GTG	AAG	GAT	AGT	AAA	AYG	TCT	ACC	CTC	TCC	TGT	AAG	AAC	AAG	ATC	ATT	240
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Xaa	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	
65				70					75					80		
TCC	TTT	GAG	GAA	ATG	GAT	CCA	CCT	GAA	AAT	ATT	GAT	GAT	ATA	CAA	AGT	288
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	
				85					90					95		
GAT	CTC	ATA	TTC	TTT	CAG	AAA	CGT	GTT	CCA	GGA	CAC	AAC	AAG	ATG	GAG	336
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu	
			100					105					110			
TTT	GAA	TCT	TCA	CTG	TAT	GAA	GGA	CAC	TTT	CTT	GCT	TGC	CAA	AAG	GAA	384
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu	
		115					120					125				
GAT	GAT	GCT	TTC	AAA	CTC	ATT	CTG	AAA	AAA	AAG	GAT	GAA	AAT	GGG	GAT	432
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	
	130					135					140					
AAA	TCT	GTA	ATG	TTC	ACT	CTC	ACT	AAC	TTA	CAT	CAA	AGT				471
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser				
145					150					155						

[Breif Explanation of the Accompanying Drawing]

FIG.1 is a peptide map of the present protein.

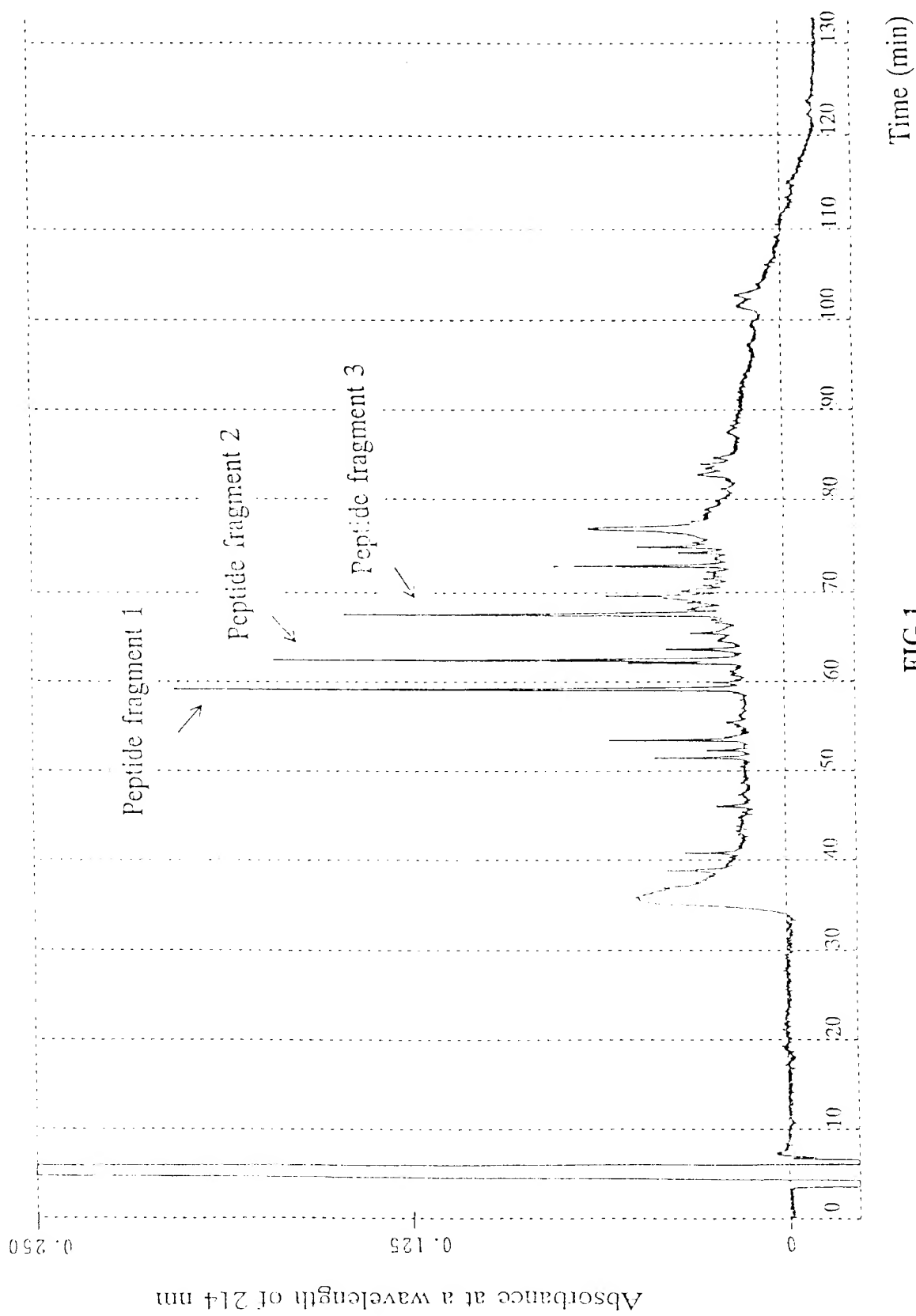


FIG.1

[Document name] Abstract

[Summary]

[Object] The object of the present invention is to provide a protein of human cell origin which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells, its preparation and uses as an agent for susceptible diseases.

[Means to Attain the Object] The present invention is constructed by a protein of human cell origin which induces the IFN- γ production by immunocompetent cells and has a specific amino acid sequence near at the N-terminus, a process for producing the protein comprising proliferating human cells which produce the protein, and an agent for susceptible diseases which contains the protein as an effective ingredient.

[Selected figure] None